INAKTIVIERUNG VON DENGUE-VIRUS TYP 2 DURCH HITZE, FORMALIN UND ß-PROPIOLACTON

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Schwartz

1980

1981

Aus dem Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf

Direktor: o.Prof.Dr.med. H.-W. Schlipköter

INAKTIVIERUNG VON DENGUE-VIRUS TYP 2 DURCH HITZE, FORMALIN UND ß-PROPIOLACTON

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Schwartz

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

"Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.Prof.Dr.M.Straßburg

Referent
gez.:Prof.Dr.H.-W.Schlipköter

Korreferent
gez.:Prof.Dr.Schmidt

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung	5
3.	Material und Methoden	6
3.1.	Virus	6
3.2.	Zellkulturen	6
3.2.1.	Verozellen	6
3.2.2.	Cercopithecuszellen	7
3.2.3.	Primäre Hamsternierenzellen	7
3.3.	Mäuse	8
3.3.1.	Passagen	8
3.3.2.	Krankheitsverlauf	8
3.4.	Isolierung	13
3.4.1.1.	Saccharose-Dichtegradient	13
3.4.1.2.	CsCl-Dichtegradient	14
3.4.2.	Elektronenmikroskopie	14
3.4.3.	Immunfluoreszenzmethode	18
3.5.	Viruskonzentrationsbestimmung	18
3.5.1.	Plaque-Test	18
3.5.2.	Titerbestimmung in Mäusen	22
3.6.	Antikörperbestimmung	22
3.6.1.	Serumgewinnung	22
3.6.2.	Radialimmundiffusion in Agargel	22
3.7.	Inaktivierung	23
3.7.1.	Hitze	23
3.7.2.	Formalin	24
3.7.3.	ß-Propiolacton	24

		Seite
3.8.	Immunisierung	25
3.9.	Sicherheitstest	26
3.10.	Adjuvantien	27
3.11.	Infektions-Belastungsversuch (Challenge-Test)	28
4.	Versuchsbeschreibung und Ergebnisse	29
4.1.	Voruntersuchung	29
4.1.1.	Virusvermehrungskurve	29
4.1.2.	Virustiter im Hirnsuspensionspool	30
4.1.3.	Immunfluoreszenzergebnisse	31
4.1.4.	Dichtegradienten	33
4.2.	Inaktivierung	36
4.3.	Challenge-Test	40
4.4.	Immunglobuline	43
4.5.	Sicherheitstest	50
5.	Diskussion	51
6.	Zusammenfassung	61
7.	Literaturverzeichnis	62
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Am 4. November 1976 bemerkte Leon ROSEN als Präsident in seiner jährlichen Ansprache vor der Amerikanischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Hygiene (59), daß schon im Sommer und Herbst des Jahres 1780 in Philadelphia von dem Arzt Dr. Benjamin RUSH ein Ausbruch von hämorrhagischen Dengue-Erkrankungen beschrieben worden ist. Seitdem sind immer wieder und mit der anwachsend genaueren Diagnostik Dengue-Virus-Erkrankungen immer häufiger bekannt geworden.

In unseren Breiten ist diese Viruserkrankung, die durch Stechmücken der Familien Aedes aegypti und albopictus übertragen wird, und deshalb in die Reihe der Arboviruserkrankungen eingeordnet wird, nicht bekannt. Allerdings wurden im Zweiten Weltkrieg auch deutsche Soldaten, die im Südpazifik operierten, vom sogenannten Denguefieber befallen. Im Gegensatz zu den hämorrhagischen Erscheinungsformen der Dengue-Erkrankung durch die serologischen Gruppen 3 und 4, ruft das Dengue-2 Virus nach einer Inkubationszeit von fünf bis acht Tagen unter plötzlichem Fieberanstieg heftige Muskel-, Kopf- und Gelenkschmerzen hervor. Durchschnittlich am zweiten Krankheitstag des sogenannten "Siebentagefiebers" tritt das eigentliche makulopapulöse Dengueexanthem (23) auf. Die Rekonvaleszenz ist oft durch Depressionen, Appetitlosigkeit oder rheumatische Beschwerden etc. verzögert. Die Therapie folgt symptomatischen Gesichtspunkten.

Erstellt man eine Übersicht (Abb. 1) über die Verbreitung von Dengue-Erkrankungen in den Jahren 1969 - 1979, so zeigt sich, daß die verschiedenen serologischen Dengue-Gruppen auch in den letzten zehn Jahren, nach wie vor, trotz einiger Ansätze von Impfungsfeldzügen im Pazifik und in Mittelamerika (65, 12) mit Hilfe attenuierter Dengue-Stämme, ende-

misch in den Staaten Südostasiens, Afrikas und Mittelamerikas in den Breiten 10 - 15 Grad beiderseits des Äquators vorhanden sind (1, 8, 9, 15, 17, 26, 27, 32, 33, 35, 43, 58, 61, 65, 67)

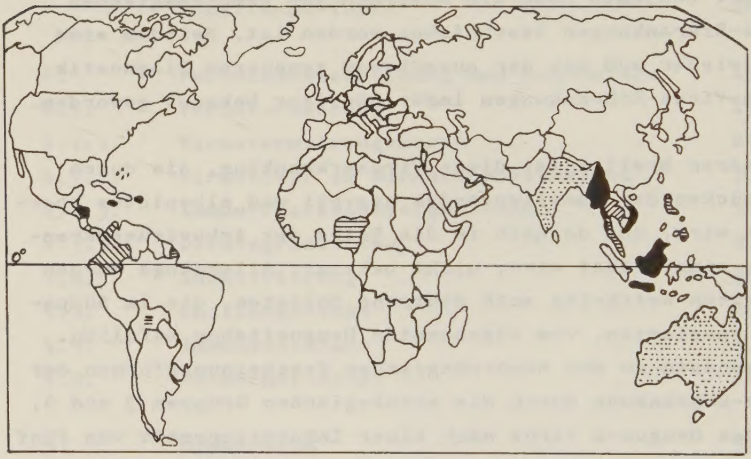


Abb. 1 Dengue-Erkrankungen in den Jahren 1969 - 1979

: ohne genaue Zahlenangaben (in Australien alle 6 - 10 Jahre Epidemien mit bis zu 500 000 Fällen)

: weniger als 5 000 Erkrankungen

: weniger als 50 000 Erkrankungen

: weniger als 100 000 Erkrankungen

: mehr als 100 000 Erkrankungen

Die endemische Ausbreitung in diesen Staaten ist durch ihre klimatischen Bedingungen für die Verbreitung der Stechmükken Aedes aegypti und albopictus erklärbar; ebenso das Auftreten von besonders starken epidemischen Dengue-Erkrankungs-

zügen, wie z.B. 1972 in Kolumbien, wo ca. 416 000 Menschen erkrankten. Die serologischen Untersuchungen weisen in diesem Fall Dengue-2 als Erreger der Fiebererkrankungen nach. Länder, in denen jedes Jahr Dengue-Erkrankungen festgestellt werden, sind vor allem Thailand und Puerto Rico. Alle sechs bis zehn Jahre gibt es in Australien Epidemiezüge mit bis zu 500 000 Erkrankungen. In einer Umfrage 1979 unter 75 zufällig ausgewählter Firmen in Düsseldorf war festzustellen, daß 21 von ihnen in den Jahren 1974 bis 1978 insgesamt zwischen 71 und 93 Arbeitnehmer pro Jahr durchschnittlich 90 Tage/Jahr in Ländern beschäftigen, in denen nach obiger Übersicht immer wieder größere Dengue-Erkrankungszahlen auftreten.

Schon 1956 gibt es Arbeiten, die sich mit der Ätherempfindlichkeit des Dengue-Virus (29) befassen. Vor allem ab dem Jahr 1969 gibt es mehrere Ansätze, die sich mit den verschiedensten Möglichkeiten einer Immunisierung gegen Dengue-Viren beschäftigen. PRICE (54, 55) und WISSEMAN (77) untersuchten die Immunisierungswirkungen attenuierten Dengue-1 und 2 Stämmen bei verschiedenen Versuchstieren. In die gleiche Richtung gehen die Untersuchungen von ECKELS (13) und TARR (75), die sich mit der Entwicklung von temperaturempfindlichen Mutanten des Dengue-2 Virus beschäftigen. EYLAR und WISSEMAN (16) arbeiteten über die Hitzeinaktivierung von Dengue-1 Virusstämmen. Über die Inaktivierung von anderen Arbovirusstämmen gibt es einige Arbeiten über Hitzeinaktivierung beim Semliki-Forest Virus (18), und beim Venezuelan Equine Encephalitis Virus (76). Andere verwendete Inaktivierungsmittel waren z.B. ß-Propiolacton (19), Formalin (47) und Protease (7).

In Affen wurde die Schutzwirkung von Reihen vorhergehender Virusinokulationen (24, 25, 54), bzw. von Kreuzreaktionen (14) durch vorhergehende Exposition anderer Arboviren aus-

getestet. Die Inokulation lebender Viren, die in obigen Arbeiten beschrieben wird, eignet sich allerdings nur für tierexperimentelle Arbeiten.

2. AUFGABENSTELLUNG

Uns interessierte erstens, im Gegensatz zu attenuierten Dengue-Vakzinen, die Möglichkeit einer genau definierten und reproduzierbaren Inaktivierung unseres Dengue-2 Stammes. Dabei interessierten uns drei Inaktivierungsarten, nämlich die Hitzeinaktivierung, die bei Dengue-1 von EYLAR und WISSEMAN (16) und bei VEE von NOVAKHATSKY angewandt wurde; ferner die Formalininaktivierung, die heute für die Vakzineherstellung am meisten verwendet wird, die wie oben erwähnt, MUSSGAY und WEILAND (47) bei der Herstellung einer inaktivierten Vakzine gegen das Semliki-Forest Virus benutzten. WHITE und BERMAN (76) verwendeten Formalin bei Eastern Equine Encephalitis Virus. ß-Propiolacton wird von ihnen ebenfalls zur Inaktivierung des EEE-Virus benutzt, ebenso bei FRENCH und McKINNEY (19).

Weiter stellte sich die Frage, welchen Schutz ein so inaktivierter Virusstamm nach einer Reihe von fünf Immunisierungsterminen, wie sie BRANDT, BUESCHER und HETRICK (3) für optimal halten, weißen Mäusen gegenüber einer Gabe von 100 LD_{50} Lebendvirus bietet. Die Immunisierungswirkung wollten wir zum einen anhand der Todesraten nach Challenge, zum anderen anhand des Anstiegs der IgG- und IgM-Titer der Mäuseseren überprüfen.

Um auf obige Fragen eine Antwort geben zu können, waren zunächst unsere Dengue-2 Viren durch Passagen in weißen Mäusen zu vermehren. Daneben waren genaue Charakterisierungs- bzw. Überwachungsmöglichkeiten für den gesamten Versuchsablauf nötig. Dabei wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Virus in Dichtegradienten, als auch die biologischen Eigenschaften beim Aufbau eines Plaque-Tests benutzt. Ferner wollten wir das Virus mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode, wie auch mit dem Elektronenmikroskop durch den Versuch hindurch beobachten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Virus

Für die Untersuchungen wurde uns freundlicherweise von Prof. Kunz, Institut für Virologie der Universität Wien eine Ampulle mit tiefgefrorenem Dengue-2 Virusmaterial mit der Virusstammbezeichnung "Tr 1751" zur Verfügung gestellt. Das Virus gehört zum Geschlecht der Flaviviren der Arbovirusgruppe B aus der Familie der Togaviridae (51). Es enthält eine einsträngige RNS, mit einem Molekulargewicht von 4×10^6 Dalton. Das Virus besitzt ein kuboides Nucleocapsid, daß von einem Lipoproteinenvelope umschlossen wird, welches sowohl Wirtszellipide als auch Glyco- und Phospholipide enthält und einen Außendurchmesser von 45-50nm hat. Das Virus ist bei einem pH-Wert von 7,0 bis 9,0 stabil. Es wird von Stechmücken der Art Aedes aegypti und albopictus übertragen.

3.2. Zellkulturen

3.2.1. Verozellen

Permanente Affennierenzellen (African Green Monkey Kidney/Ken) wurden von den Flow Laboratories, Bonn, als permanente Zellkultur bezogen. In 32oz Roux-Flaschen wurden die Zellen sowohl auf Eagle's Basalmedium (mit Glutamin, Bikarbonat und Earle's Salzen, als auch auf Dulbecco Minimal Essential Medium mit Bikarbonat und Glutamin passagiert. Beide Wachstumsmedien enthielten als Zusatz 10 % fetales Kälberserum (38), 1 % Fungizone (Flow Lab.Cat. 16-723-46) und 1 % Penicillin (5000 IE/ml), Streptomycin (5000 mcg/ml) (Flow Lab.Cat. 16-700-49). Nach Erreichen einer genügenden Zelldichte wurden die Kulturen trypsinisiert, gewaschen und

gesplittet, so daß eine Einsaat in 80 ml T-Flaschen mit 8×10^5 Zellen und mit 1×10^5 Zellen in Linbro-8 Platten (Flow Lab.) erfolgen konnte.

Als Erhaltungsmedium wurde Eagle's Basalmedium (BME-E) mit Earle's Salzen verwendet, daß zusätzlich 2 % fetales Kälberserum (38, 73), 1 % Fungizone und 1 % Penicillin/ Streptomycin enthielt.

Nach der Beimpfung des Einschicht-Zellrasens wurde das Erhaltungsmedium je nach pH-Wert-Veränderung mit 7,5 %-igem Natriumbikarbonat nachgepuffert.

3.2.2. Cercopithecuszellen

Die primären Affennierenzellen (Grüne Meerkatze) wurden mit Minimal Essential Medium angezüchtet. Das gleiche Medium wurde auch als Erhaltungsmedium benutzt. Beim Erhaltungsmedium wurde der fetale Kälberserumzusatz von 10 % beim Wachstumsmedium auf 2 % reduziert. 1 % Fungizone als auch 1 % Penicillin/Streptomycin wurden ebenfalls zugesetzt.

3.2.3. Primäre Hamsternierenzellen

Die Nieren wurden vierzehn Tage alten syrischen Goldhamstern entnommen, danach nach der von J. HENTSCHKE 1969 in Berlin inaugurierten Methode aufbereitet, d.h. in Phosphatpuffer (PBS) grob zerkleinert, in 0,25 %-iger Trypsinlösung (1 : 250 Difco) 1/2 Stunde bei 37° C suspendiert und dann durch Gaze abfiltriert. Das Filtrat wurde mehrfach zentrifugiert und mit Anzuchtmedium eine Stammsuspension von 5×10^5 Zellen/ml hergestellt.

Als Anzuchtmedium wurde die Glasgow Modifikation des Minimal Essential Medium (Flow Lab.) mit 2-facher Aminosäuremenge, 10 % fetales Kälberserum und 10 % Tryptosephosphatbrühe benutzt. Das Erhaltungsmedium setzte sich aus GMEM, 10 % Lactalbuminhydrolysat und 2 % Kälberserum zusammen.

3.3. Mäuse

3.3.1. Passagen

Das Virus wurde insgesamt zwölfmal in NMRI-Mäusen (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) passagiert. Drei Tage (3, 11, 22, 10) alte Babymäuse wurden mit je 0,02 ml (6, 70) Hirnsuspension der vorhergehenden Passage intracerebral beimpft. Zur Weiterbeimpfung wurden die Hirne am sechsten Tag (9, 2) nach der Inokulation geerntet. Bei der Aufbereitung wurden die Hirne in einem Sorvall-Omnimixer (Sorvall Inc., Newtown, Conneticut) homogenisiert, danach mit Trispuffer, pH= 8,2 (3, 73, 40) zu einer 10 %-igen (w/v) Suspension aufgeschwemmt. Die Suspension wird dann 10 Minuten bei 4^{o} C mit 4500 UpM (79) in einer Minifuge (Fa. Christ) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit einem Falcon Filter 7103 geklärt. Das Filtrat wurde entweder direkt weiterverimpft oder auf -70^{o} C eingefroren.

3.3.2. Krankheitsverlauf

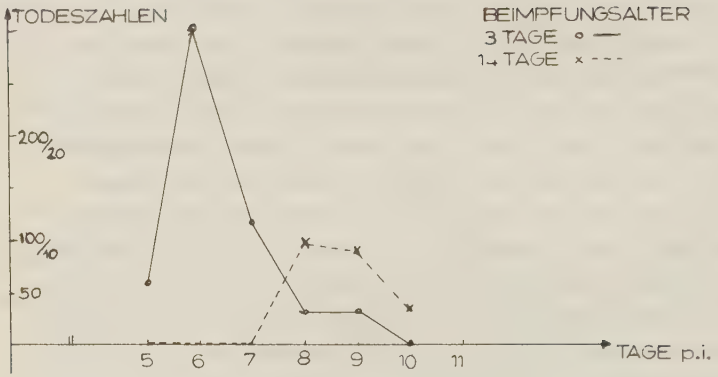
Parallel zur Virusvermehrungskurve auf Zellkulturen, wurden die Wirkungen und die Zeitdauer bis zum Auftritt von Krankheitserscheinungen bzw. dem Tod der Mäuse nach der intracerebralen Beimpfung mit Lebendvirus ausgetestet. Im Hinblick auf den Immunisierungsversuch stellte sich vor allem die

Problematik, daß die Mäuse nicht so jung wie bei den Passagen (3 Tage) sein durften, weil sie zu diesem Zeitpunkt noch mütterliche Antikörper besitzen, zum anderen durften sie nach der kompletten Immunisierung nicht so alt sein, daß man nicht mehr mit Sicherheit annehmen konnte, daß sie an der Dengue-2 Infektion bzw. Dengue-Challenge sterben würden. So wählten wir Tiere, die beim ersten Immunisierungstermin 14 Tage alt waren, und die zum Zeitpunkt des Challengetests 54 Tage alt sein würden. Bei diesen Tieren konnte man nach COLE und WISSEMAN (10), die dies bei Dengue-1 ausgetestet haben, annehmen, daß sie wohl signifikant sterben würden. Da man annehmen mußte, daß es trotz der äußerst keimarmen Umgebung (Klima- und Schleusenanlage) zu Stallinfektionen kommen konnte, war es wichtig zu wissen, in welchem Zeitraum 3 und 14 Tage alte Mäuse charakteristischerweise an Dengue-2 sterben, um etwaige Todesfälle während des Immunisierungszeitraumes auf den Impfstoff zurückführen zu können.

Bei der Untersuchung ergab sich folgendes Bild:

Infektionsdosis 10^4 PBE/0,02 ml ic.		
	Alter d. Mäuse b. Inokulation	
	3 Tage	14 Tage
Todesraten x Tage p.i.		
5	63	Ø
6	313	Ø
7	121	Ø
8	37	10
9	39	9
10	1	4
überlebende Tiere	22	4
Gesamtzahlen	687	27

Tab. 1



Tab. 2

Aus den Tabellen 1 und 2 ist ersichtlich, daß ca. 63 % der Babymäuse am 6. und 7. Tag post infektionem sterben. Demgegenüber sterben 70 % der im Alter von 14 Tagen beimpften Tiere am 8. bis 9. Tag. Den Tieren konnte, wie die Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen, deutlich der Verlauf einer Dengue-2 Erkrankung, wie sie COLE und WISSEMAN (10) bei Dengue-1 in Mäusen beschrieben haben, angesehen werden. Abb.4 zeigt eine gesunde Kontrollmaus (die Kerbe am linken Ohr dient der Markierung). In Abb. 5 sieht man eine Maus am 6. Tag p.i., die im Alter von 14 Tagen mit 10^4 PBE/0,02 ml intracerebral mit dem späteren Challengestamm MP 7GF' be-

impft wurde. Sie ist lethargisch, hat ein rauhes Fell, läuft steifbeinig auf den Hinterbeinen und nimmt eine bucklige Haltung ein. Abbildung 6 zeigt die gleiche Maus am 9. Tag p.i. Sie ist zu diesem Zeitpunkt deutlich abgemagert, leidet an einer Begleitkonjunktivitis und hat eine Parese der Hinterbeine, die später in eine komplette Tetraplegie übergeht, bevor die Maus stirbt. Somit ist gesichert, daß später sowohl beim Immunisierungsversuch als auch beim Challenge-Test eine etwaige Dengue-Erkrankung sich gut von anderen Infektionen unterscheiden läßt.

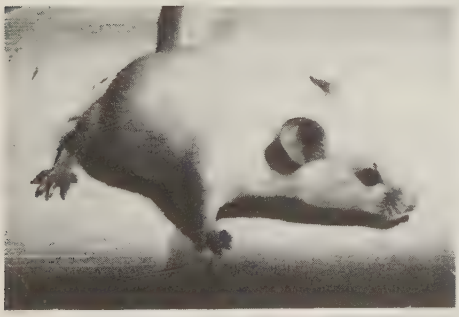


Abb. 2: Gesunde Kontrollmaus

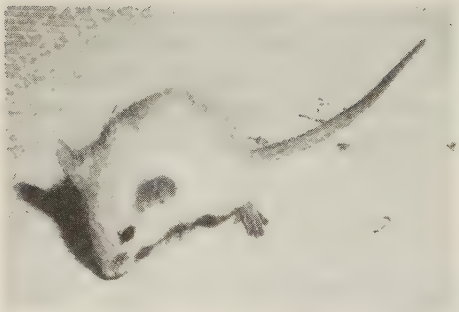


Abb. 3: Kranke Maus am 6. Tag nach der Beimpfung

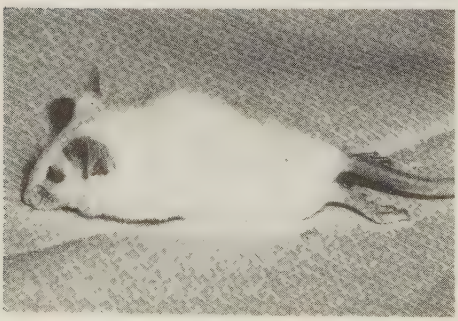


Abb. 4: Kranke Maus am 9. Tag nach der Beimpfung

3.4. Isolierung

Zur Vorbereitung auf die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Hirne deutlich kranker Mäuse am 6. Tag post infektionem mit Trispuffer (pH 8,2) zu 10 %-igen Suspensionen homogenisiert. Die Suspensionen wurden anschließend 15 Minuten bei 4° C mit 3000 UpM in der Minifuge zentrifugiert. Dem Überstand wurde 3 mg/ml Protaminsulfat (3) zugesetzt und erneut 30 Minuten mit 2000 UpM (46) zentrifugiert. Danach wurden jeweils 2 ml des Überstandes durch 3 ml einer 30 %-igen Saccharose-Lösung 90 Minuten (3) bei 31 000 UpM = 105 000 x g zentrifugiert und dann das Sediment in 1 ml 0,01 m Phosphatpuffer aufgenommen.

3.4.1.1. Saccharose-Dichtegradient

Nach dieser Klärung wurden jeweils 1 ml der Virussuspension auf 4 ml eines tags zuvor präformierten Saccharosegradientens aus je 0,5 ml 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % und 1 ml 70 % Saccharose gegeben. Die Zentrifugation wurde dann mit 105 000 x g 90 Minuten lang in einem SW 65 K-Rotor in einer L2 65 B Ultra-Zentrifuge der Firma Beckman ausgeführt. Die Fraktionierung wurde mit einem Density Gradient Fraktionator Isco Colora von der Oberfläche des Röhrchens aus vorgenommen. Die Ausflußgeschwindigkeit (Flowrate) des Fraktionators betrug 0,2 ml pro min bei 0,2 ml/Röhrchen je Fraktion. Der Isco-Fraktionator maß dabei automatisch bei einer Empfindlichkeitseinstellung von 2,0 die Extinktion der Fraktionen bei einer Wellenlänge von 256 nm und übertrug die Daten auf einen automatischen Schreiber. Nachher wurde die Extinktion der sich in den Röhrchen zeigenden Banden nach einer Verdünnung mit 1 ml eines 0,01 m Phosphatpuffers mit einem Zeiss M4 QIII Photometer nochmals bei Wellenlängen von 256 nm und 280 nm gemessen, d.h. im Bereich der Absorption von Nucleinsäuren

bzw. Proteinen. In einem Zeiss-Refraktometer wurde zuvor die Dichte der einzelnen originären Fraktionen bestimmt. Danach wurden die Fraktionen in Mäusen und in Zellkulturen austitriert (s.Abb. 23).

3.4.1.2. CsCl-Dichtegradient

Der Gradient wurde aus 5,10 g CsCl und 12 ml Aqua bidest. und 3 ml des wie unter 3.4. geklärten Hirnsuspensionsmaterials angesetzt. Die Zentrifugation wurde in 5 ml Röhrchen in einem SW 65 K Rotor in einer L 2 65 K Beckman Ultra Zentrifuge bei 40 000 UpM 68 Std lang bei 4° C durchgeführt. Die Fraktionierung wurde wie unter 3.4.1.1. vorgenommen. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde nach der Methode von IFFT (29) berechnet.

3.4.2. Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Beobachtung des Dengue-2-Virus wurden die Hirne deutlich kranker Mäuse in 3 % gekühltem Glutaraldehyd in 0,1 m Phosphatpuffer (pH = 7,4) (31, 5) 60 Minuten lang fixiert, danach mit Puffer ausgewaschen und dann 120 Minuten in 1 %-igem Osmiumtetroxid (5) eingelegt. Nach nochmaligem Waschen mit Puffer wurden die Hirne in einer aufsteigenden Alkoholserie von 50 bis 100 % und zweimaligem Acetonaufenthalt entwässert. Im Anschluß wurden sie in Durcupan ACM (Fa. Fluka) eingebettet und bei 60° C 48 Stunden gehärtet. Die Schnitte wurden mit dem LKB Ultratom III (Knifemaker LKB 7800) angefertigt. Die Kontrastierung wurde mit 7 % Uranylacetat und Bleicitrat (5) durchgeführt. Mit einem Philips 300 Elektronenmikroskop wurden die Schnitte dann bei bis zu 55 000 facher Instrumentenvergrößerung durchgemustert. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 5 bis 10.

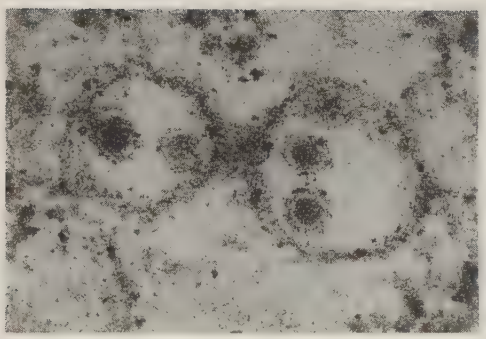


Abb. 5 Hirnschnitt aus der 12. Mäusepassage
Vier komplette Dengue-2 Partikel in Abschnürungen des Endoplasmatischen Retikulums.
Vergr. 273 000 fach

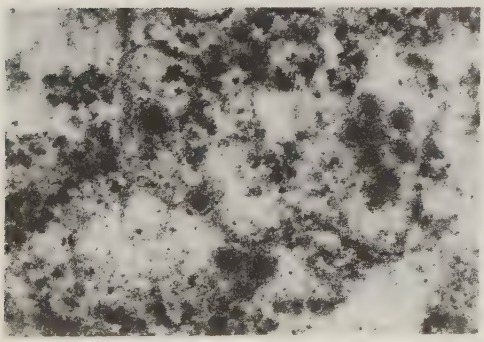


Abb. 6 Hirnschnitt aus der 4. Mäusepassage
Mehrere einzeln liegende und gruppierte Dengue-2 Virionen
Auch hier elektronendichter Kern und Envelope gut zu unterscheiden
Vergr. 162 000 fach

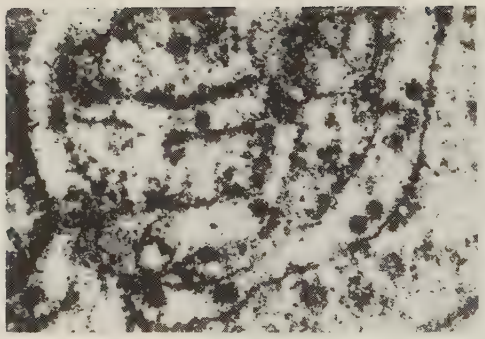


Abb. 7: Hirnschnitt aus der 4. Hirnpassage
Mehrere komplette Dengue-2 Partikel
im Endoplasmatischen Retikulum
Vergr. 121 000 fach

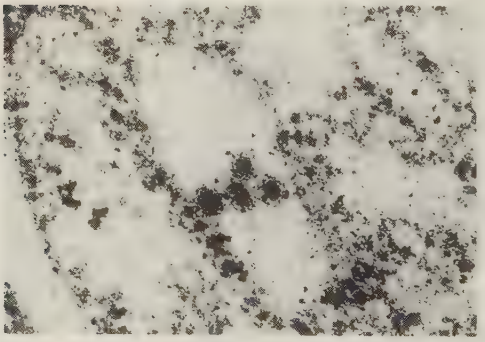


Abb. 8: Hirnschnitt aus der 12. Mäusepassage
Gruppe von kompletten Dengue-2
Viren
Vergr. 170 500 fach

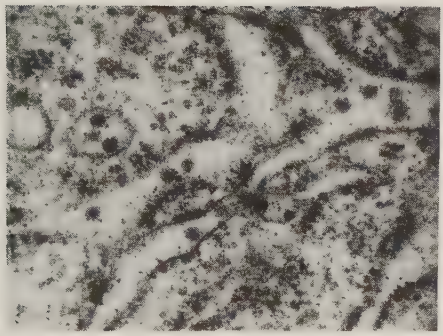


Abb. 9: Hirnschnitt aus der 4. Hirnpassage
Mehrere Dengue-2 Virionen im
endoplasmatischen Retikulum
Vergr. 60 000 fach

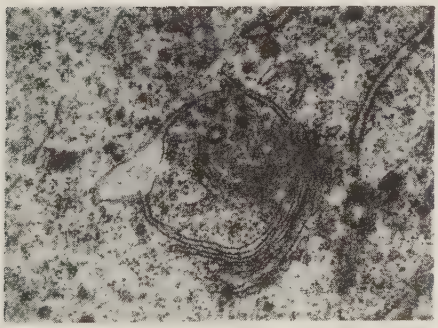


Abb.10: Hirnschnitt aus der 4. Hirnpassage
Dengue-2Virionen im Golgi Apparat
Vergr. 40 000 fach

3.4.3. Immunfluoreszenzmethode

Die Anwesenheit von Dengue-Antigen in den Hirnen der Mäusepassagen, als auch in den für die Immunisierung verwendeten Ansätzen sowie in den Zellkulturen, die zur Virustitration verwendet wurden, wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenztechnik (2, 70) nachgewiesen. Die infizierten Zellkulturen wurden zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Plaques 30 Minuten in Coons-Puffer gespült und nach Lufttrocknung in -30° C kaltem absolutem Äthanol fixiert. Nachdem die Kulturen bei 37° C mit menschlichen Dengue-Hyperimmunseren (für die Überlassung positiver menschlicher Dengue-Seren danke ich Herrn Prof. Dr. Kunz in Wien) überschichtet. Der Nachweis der an das Virus gebundenen Antikörpermoleküle erfolgte mit einem gegen menschliches Gammaglobalin gerichtetem (anti IgG) spezifischem Antiserum vom Schwein (SwAHu, der Firma Nordic, Verdünnung 1:50). Danach wurden die Kulturen gewaschen und zur fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung eingebettet.

3.5. Viruskonzentrationsbestimmung

Um genaue Angaben über die Virusmenge in den Versuchsansätzen zu bekommen, war es von Wichtigkeit, eine Methode zu haben, die uns Aussagen über die Konzentration in den Hirn-, bzw. Zellkultursuspensionen macht.

3.5.1. Plaque-Test

Nach den Arbeiten von SCHULZE und SCHLESINGER (63), als auch RAO (57) bewirkt das Dengue-Virus auf Verozellkulturen unter einem halbviskösen Medium mit Carboxymethylcellulose innerhalb von sechs bis sieben Tagen eine Plaquebildung.

Die Verozellen wurden, wie oben beschrieben, angezüchtet und mit 1 x 10^5 Zellen/ml mit je 2 ml pro Kästchen in Linbro-8 Platten (Flow Lab.) eingesät und im CO_2 - Schrank bei 37° C und 5 % CO_2 herangezüchtet. Sobald die Zellrasen geschlossen waren, wurden sie zur Beimpfung zweimal mit PBS gewaschen. Je 0,2 ml der aufbereiteten (s. oben) Hirn- bzw. Zellkultursuspensionen wurden dann in 1,8 ml Wachstumsmedium 2 Stunden lang (57, 63, 38) bei 37° C im CO_2-Schrank mit 5 % CO_2 an den Zellrasen adsorbiert. Im Anschluß daran wurde der Zellrasen wieder zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde jedes der Linbro-8 Plättchen mit 2 ml des Carboxymethylcellulosemediums, das sich aus normalem Wachstumsmedium (s.oben) und 2 % Carboxymethylcellulose (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) zusammensetzte, überschichtet. Unter diesem halbviskösen Medium wurden die Zellkulturen sechs Tage ohne umzustellen im CO_2-Schrank mit 5 % CO_2 bei 37° C bebrütet. Am 6. Tag post infektionem wurde das CMC-Medium abgesaugt und die Kulturen zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

Daraufhin wurden die Kulturen 30 Minuten in Bouin'scher Lösung (15 ml ges. Pikrinsäurelösung + 5 ml Formalin + 1 ml Eisessig) fixiert und anschließend in der üblichen Weise mit Hämatoxylin-Eosin (ROMEIS (56) § 703) gefärbt. So waren die 1 - 2 mm Ø großen Plaques, wie die Abbildungen 11 bis 13 zeigen, gut makroskopisch als auch mikroskopisch abzulesen.

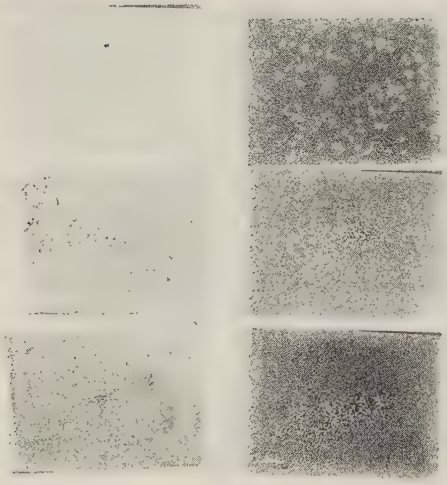


Abb. 11 Abb. 12 Abb. 13

Abb. 11: Unbeimpfte Verozellkultur auf Linbro-8 Plättchen (negative Kontrolle)

Abb. 12: Verozellkultur auf Linbro-8 Plättchen von oben nach unten: 10^{-4}-10^{-6} Verd.d.1. Mäusepassage

Abb. 13: Verozellkultur auf Linbro-8 Plättchen von oben nach unten: 10^{-4}-10^{-6} Verd.d.5. Mäusepassage

Der Titer der Virussuspensionen wurde in der nach LORENZ (39) angegebenen Weise, durch Auszählung der auf den mit absteigenden Verdünnungsreihen beimpften Zellkulturen auftretenden Plaques ermittelt. Der Titer wurde in "Plaquebildenden Einheiten" (PBE oder PFU) angegeben.

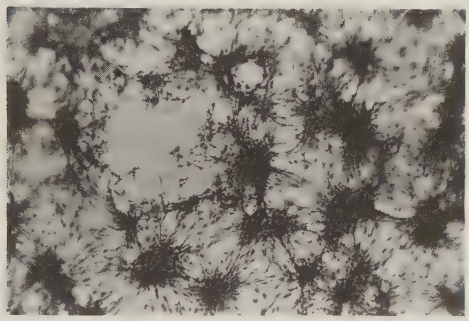


Abb. 14: Plaque in 7 Tage alter Verozellkultur beimpft mit 10^{-4} Verd.d. 3. Mäusepassage Phasenkontrastaufnahme mit Leitz Diavert Photomikroskop 20-fach

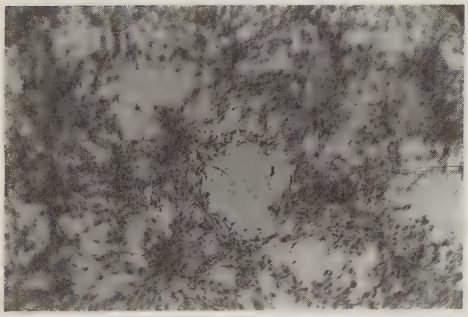


Abb. 15: Mehrere Plaques in 7 Tage alter Verozellkultur beimpft mit 10^{-5} Verd.d. 5. Mäusepassage Phasenkontrastaufnahme mit Leitz Diavert-Photomikroskop 20-fach

3.5.2. Titerbestimmung in Mäusen

Würfe drei Tage alter Babymäuse wurden mit je 0,02 ml absteigender Verdünnungsreihen der jeweiligen geklärten Hirn- bzw. Zellkultursuspensionen intracerebral beimpft. Die 50 %-ige Letaldosis (LD_{50}) jeder verimpften Suspension wurde dann durch die Todesraten in den Würfen mittels der Methode nach SPEARMAN (69) und KÄRBER (34) in dem nach WIRTH angegebenen Verfahren (76) berechnet.

3.6. Antikörperbestimmung

3.6.1. Serumgewinnung

Das Blut wurde durch Punktion des orbitalen Venenplexus der Mäuse mittels einer Pasteurpipette gewonnen. Entnahmezeitpunkt waren der 3., 6. und 9. Tag nach der letzten Immunisierung. Das Blut durfte für ca. 2 Stunden nach der Entnahme bei Lufttemperatur (21° C) gerinnen. Im Anschluß daran wurden die Serumproben bei 10° C 10 Minuten lang mit 3000 UpM in der Minifuge zentrifugiert. Bis zur Austitrierung wurden die Proben bei + 4° C aufbewahrt.

3.6.2. Radialimmundiffusion im Agargel

Der Immunglobulingehalt wurde semiquantitativ mittels der Radialimmundiffusionstechnik im Agargel bestimmt (60, 68).

Auf je 10 ml Agargel wurden 0,1 ml (0,2 ml) Anti-Maus IgG oder Anti-Maus IgM vom Kaninchen (Fa. Paesel, Frankfurt a.M.) gegeben und je 2 ml hiervon auf einen Objektträger aufgetragen. In jedes der gestanzten Löcher (2,7 mm Ø) wurde dann 0,1 ml Serum (IgG) bzw. 0,005 ml Serum (IgM) eingefüllt. Die Seren wurden in jeweils fünf Verdünnungsstufen (1:128 bis 1:2048 bei IgG und 1:4 bis 1:64 bei IgM) aus-

titriert. Zur Präzipitation wurden die Objektträger 32 Stunden (IgG) und 48 Stunden (IgM) in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Zum Entfernen nicht präzipitierter Proteine wurden die Objektträger 3 Tage in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt und 30 Minuten mit Aqua bidest.nachgespült.

Danach wurde mit Amidoschwarz 108 (Dauer: 10 Min.) eine spezifische Proteinfärbung durchgeführt.

3.7. Inaktivierung

WHITE, BERMAN und LOWENTHAL (76) verwendeten zur Inaktivierung des Eastern Equine Encephalomyelitis Virus, einem Alphavirus, das wie Dengue zu den Togaviridae gehört, sowohl Hitze als auch Formalin und ß-Propiolacton. Diese drei Arten der Inaktivierung waren unserer Meinung nach die geeignetsten, das Dengue-2 Virus reproduzierbar zum Zwecke der Immunisierung abzutöten. Zu allen Inaktivierungs-, bzw. Immunisierungsansätzen verwendeten wir ausschließlich Hirne der Mäusepassagen 6, 7 und 8 des Dengue-Virus. Die Hirne wurden in bekannter Weise (s. oben) zu Suspensionen aufbereitet und gepoolt.

3.7.1. Hitze

Die geklärten Suspensionen wurden in Gasflaschen abgefüllt und mit einem Gummistopfen verschlossen, um eine 4-stündliche Entnahme zu ermöglichen. Die Flaschen wurden in einem Wasserbad bei 41° C (76, 16, 18) 72 Stunden lang bebrütet.

3.7.2. Formalin

Zu den in gleichen Glasflaschen angesetzten Hirnsuspensionen wurde Formalin in einer Menge zugesetzt, so daß sich eine Verdünnung von 1:2000 (0,05 %) (v/v) (76) einstellte, gegenüber der Arbeit von MUSSGAY et al. (47), bei denen sich eine Endverdünnung von 0,3 % (v/v) zur Inaktivierung von Semliki Forest Virus ergab. Die Suspensionen wurden kräftig geschüttelt und danach 4 Tage bei 22° C im Wasserbad und dann 10 Tage bei + 4 - 6° C im Kühlschrank Eisfink aufbewahrt. Auch hier werden alle 4 Stunden Proben entnommen.

3.7.3. ß-Propiolacton

Die Inaktivierung der aufbereiteten Hirnsuspensionen durch ß-Propiolacton wurde nach der Methode von FRENCH und McKINNEY (19) durchgeführt.

ß-Propiolacton wurde in einer 0,05 molare Natriumbiphosphat-Lösung zu einer 1,6 %-igen (v/v) Lösung verdünnt. Diese Lösung wurde bis zu einer Endverdünnung von 0,16 % der Hirnsuspension in den Glasflaschen zugesetzt. POOLEY und GUERIN (50) arbeiten bei Influenza- und Poliovirus mit Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 %.

Nach kräftigem Schütteln wurden die Suspensionen 4 Tage lang bei + 4 - 6° C im Kühlschrank Eisfink gehalten, um sowohl die Inaktivierung als auch die Hydrolyse des ß-Propiolactons zu ermöglichen. Auch hier wurde eine 4-stündliche Probeentnahme vorgenommen.

3.8. Immunisierung

Den immunisierenden Effekt der auf die drei verschiedenen Arten inaktivierten Dengue-2 Virussuspensionen wollten wir in weißen Mäusen beobachten, da die junge Maus die empfindlichste Möglichkeit bietet, um nach einer Infektions-Belastung mit Lebendvirus, Aussagen über den Schutz vor den sonst eintretenden Lähmungserscheinungen bzw. dem Tod durch das Virus machen zu können. Kein anderes Säugetier bietet eine so gut abgestufte Reaktion auf das lebende Dengue-2 Virus.

Nach der Arbeit von COLE und WISSEMAN (10) dürfen die Mäuse zum Zeitpunkt des Challenge-Testes nicht zu alt sein, da sonst die sichere Todesrate weit unter 100 % liegt. Lediglich die hochinfektiöse 125. Mäusepassage erzielt bei ihnen durchschnittlich in 12,5 d noch 100 % tote Tiere, wenn die Mäuse zum Zeitpunkt der Beimpfung 12 Wochen alt waren.

Andererseits werden die Mäuse noch einen hohen Immunglobulintiter durch maternale Antikörper im Rahmen der angeborenen Immuntoleranz haben, wenn man den ersten Immunisierungstermin zu früh ansetzt.

Aus diesem Gründen wählten wir Mäuse (NMRI-Rasse), die beim ersten Immunisierungstermin 14 Tage alt waren, die nach eigenen Versuchen zufolge (s. Beimpfung von 14 Tage alten Mäusen mit Lebendvirus in 3.3.2.) noch spätestens nach 9 Tagen signifikant an Dengue-2 sterben.

Um eine optimale Immunisierung zu erzielen, hielten wir uns an ein Beimpfungsschema, das BRANDT, BUESCHER und HETRICK (3) zur Erzielung von Antikörpern in Aszitesflüssigkeiten der Maus als optimal angeben, d.h. das Schema 7 der obigen Arbeit.

Das bedeutet, es wurden 5 Immunisierungstermine angesetzt. Die Tiere erhielten am 1. und 4. Tage je 0,2 ml inaktiviertes Antigen subcutan verimpft. Bei den Versuchsansätzen mit Adjuvantien wurde vor der Beimpfung die gleiche Menge Adjuvans hinzugesetzt und kräftig geschüttelt. Bei der Verwendung von Freund's Adjuvans wurde beim ersten und zweiten Immunisierungstermin am 1. und 4. Tag bei einer Gesamtinokulatmenge von 0,4 ml s.c. komplettes Adjuvans, d.h. mit Mykobakterien, verwendet. Bei den folgenden drei Terminen, 21., 24. und 27. Tag wurden Gesamtmengen von 0,5 ml intraperitoneal unter Verwendung von Freund's inkompletten Adjuvans eingesetzt. Durch diesen Wechsel vom kompletten zum inkompletten Adjuvans sollten allergische Reaktionen vermieden werden.

So ergaben sich folgende Immunisierungskombinationen:

1)	Hitze	inak.Material	ohne Adjuvans
2)	Hitze	inak.Material	+ Freund's Adjuvans
3)	Hitze	inak.Material	+ Al $(OH)_3$
4)	Formalin	inak.Material	ohne Adjuvans
5)	Formalin	inak.Material	+ Freund's Adjuvans
6)	Formalin	inak.Material	+ Al $(OH)_3$
7)	ß-Propiolacton	inak.Material	ohne Adjuvans
8)	ß-Propiolacotn	inak.Material	+ Freund's Adjuvans
9)	ß-Propiolacton	inak.Material	+ Al $(OH)_3$

3.9. Sicherheitstest

Alle inaktivierten Virusansätze wurden zur Feststellung der Restinfektiosität sowohl in Mäusen als auch in Verozellkulturen austitriert.

Zur Untersuchung kamen jeweils die Proben, die vier Stunden nach derjenigen entnommen wurden, die beim Inaktivierungsversuch keinerlei Infektiosität mehr aufwiesen, d.h. bei der Hitzeinaktivierung die Probe nach 16 Stunden, bei der Formalininaktivierung nach 28 Stunden und beim ß-Propiolactonversuch nach 20 Stunden.

Um die Toxizität des Formalins und des ß-Propiolactons auszuschalten, wurde bei der Untersuchung der Proben der Formalininaktivierung dem Formalin entsprechende Mengen an Natriumbisulfit (41, 47) zugesetzt. Die BPL-Proben wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge mit 18.000 x g 2 Stunden lang zentrifugiert und das Sediment in Tris-Puffer (pH = 7,4) aufgenommen.

Die Inaktivierungsendproben wurden auf Verozellkulturen in 0,2 ml Mengen in Linbro-8 Platten unter Carboxymethylcellulosemedium 10 Tage lang auf das Auftreten eines CPE bzw. auf Plaquebildung überprüft.

In 3 Tagen alten Babymäusen wurden die Proben in 0,02 ml Mengen intracerebral appliziert und die Tiere 14 Tage lang auf evtl. Krankheits-, bzw. Todesfälle im Gegensatz zu den Kontrolltieren beobachtet.

Ferner wurden die Endpunktproben auf aerobe und anaerobe Keime untersucht.

3.10. Adjuvantien

Als Adjuvantien wurden komplettes (Difco, Kat.Nr. 626892) und inkomplettes (Difco, Kat.Nr. 593221) Freund's Adjuvans und Aluminiumhydroxid $Al(OH)_3$ in einer 0,2 %-igen Aufschwemmung (41) in physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

Zur Immunisierung der Versuchstiere wurden die Adjuvantien den Antigenen frisch, in gleichen Teilen (1:1) zugesetzt und gut geschüttelt. Bei einem Gesamtinoculum von 0,4 ml bei subcutanen, bzw. 0,5 ml bei intraperitonealen Injektionen betrug die Menge an Freund's Adjuvans oder Al $(OH)_3$ jeweils 0,2 ml bzw. 0,25 ml.

3.11. Infektions-Belastungsversuch (Challenge-Test)

Der Challenge-Test wurde in Anlehnung an die Arbeit von CASALS, BUCHLEY und BARRY (6) über die "Resistenz von Mäusen gegen Arboviruschallenge sofort nach einer Vaccination mit EEE/SF/VEE/Wn und CTF Virus" durchgeführt. Die Mäuse waren zur Zeit des Challenge-Tests, 10 Tage nach der letzten Immunisierung, 54 Tage alt. Nach COLE et al. (10), wie auch nach eigenen Untersuchungen (s. 3.3.2.) konnte beim Challenge-Test mit 100 LD_{50} (8. Mäusehirnpassage) intracerebral mit einer Todesrate von 85 - 100 % der Kontrolltiere innerhalb von 10 Tagen gerechnet werden. Bei Mäusen dieses Alters muß mit so hohen Dosen Lebendvirus vorgegangen werden, weil sonst schon bei der Kontrollgruppe keine genügend hohe Todesrate erzielt wird, um gegenüber den immunisierten Tieren signifikante Unterschiede feststellen zu können. Die Würfe wurden ab dem Beimpfungstag mit Lebendvirus 31 Tage lang beobachtet.

Mit dem X^2 Test wurden die Todesraten der immunisierten Tiere in einer Vierfeldertafel mit denen der Kontrolltiere auf signifikante Unterschiede verglichen. Die Prüfgröße wurde mit Hilfe der Yates'schen Korrekturformel berechnet (6). Der Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Voruntersuchung

Bevor der Inaktivierungsversuch durchgeführt werden konnte, mußten die Ergebnisse der Grunduntersuchung vorliegen.

4.1.1. Virusvermehrungskurve

Für die Virusanzüchtung war die Virusvermehrungskurve auf Verozellen von Bedeutung. Die Verozellmonolayer in T-Flaschen wurden mit 50-facher Multiplizität mit derselben Charge Virus (6., 7. und 8. Mäusehirnpassage) wie im Inaktivierungsversuch beimpft. Eine Stunde post infektionem wurde die 1. Probe, dann alle 4 Stunden bis zu 25 Stunden jeweils eine weitere T-Flasche dem Brutschrank (37° C) entnommen. Der Mediumüberstand wurde abgegossen und bei + 4° C 10 Minuten bei 3000 UpM in der Minifuge zentrifugiert. Aus den sofort auf -70° C eingefrorenen Überständen wurden dann nach gemeinsamem Auftauen mittels des Plaque-Tests die Menge der Plaquebildenden Einheiten (PBE/PFU) pro ml Überstand bestimmt (5).

Die Virusvermehrungskurve aus den Überständen der Verozellkulturen ergibt sich aus folgender Abbildung (22):

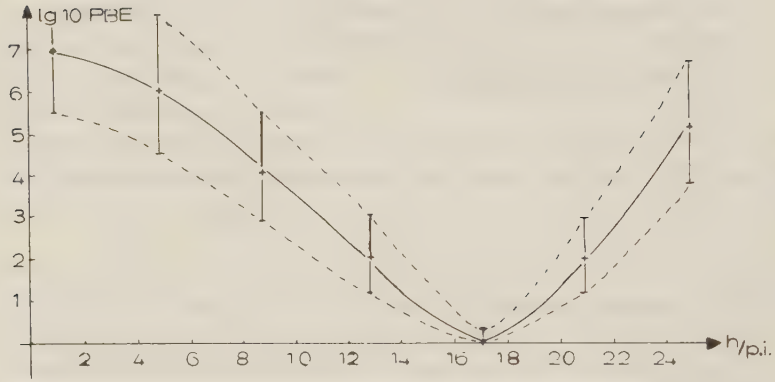


Abb. 16

Die 99 % Vertrauensgrenzen wurden der Arbeit von LORENZ (30) "Zur Statistik des Plaque-Testes" entnommen.

In dieser Kurve liegt der Zeitpunkt der Eklipse bei 17 Stunden post infektionem. Er korreliert sehr gut mit den von uns im Elektronenmikroskop erhobenen Befunden. In Zellkulturen, die 18 Stunden post infektionem fixiert wurden, ist das Cytoplasma übersät mit Vesikeln, die Viruspartikel enthalten. 48 Stunden nach der Beimpfung findet man fast alle Viruspartikel außerhalb des Cytoplasma liegend.

4.1.2. Virustiter im Hirnsuspensionspool

Für die Inaktivierungsansatz war die Kenntnis über den Titer des Hirnsuspensionspools aus den Mäusepassagen 6, 7 und 8 von Wichtigkeit.

Wie bei allen Hirnsuspensionen der aufeinander folgenden Mäusepassagen wurde auch der Titer dieses Hirnsuspensionspools mit dem Plaque-Test auf Verozellkulturen unter Carboxymethylcellulosemedium (s. 3.5.1.) durchgeführt.

Abb. 17

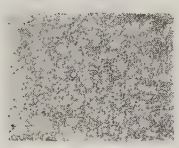


Abb. 18

Abb. 17: Verozellkultur mit negativer Kontrolle HE.-Färbung

Abb. 18: Verozellkultur, beimpft mit 10^{-3} Verd.d. Mäusepassagen 6, 7 und 8, HE-Färbung

Es ergab sich ein Titer von 1,6 x 10^{7} PBE/ml Hirnsuspension für alle drei Mäusegehirnpassagen.

4.1.3. Immunfluoreszenzergebnisse

Der quantitativen Virusbestimmung schloß sich, wie auch nach jeder Viruspassage der Babymäuse ein qualitativer Test an.

Mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode mit Dengue-2-Hyperimmunseren wurde festgestellt, ob der auf Verozellen

auftretende cytopathologische Effekt auf der Infektion durch unser Dengue-2 Virus beruhte (Identitätsprüfung). Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die charakteristische Fluoreszenz des Cytoplasmas der Verozellen am Rande eines Plaques. Die Zellen wurden mit dem Hirnsuspensionspool 6, 7 und 8 beimpft und am 6. Tag p.i. fixiert.

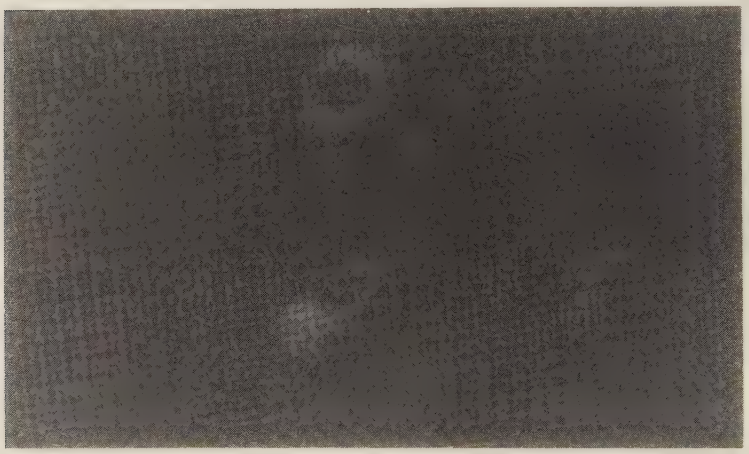


Abb. 19: Fluoreszenz des Cytoplasmas von Verozellen, die mit Dengue-2 6 Tage vorher beimpft worden waren.
Markierung des Virusmaterials mit Hilfe der obigen Immunfluoreszenzmethode

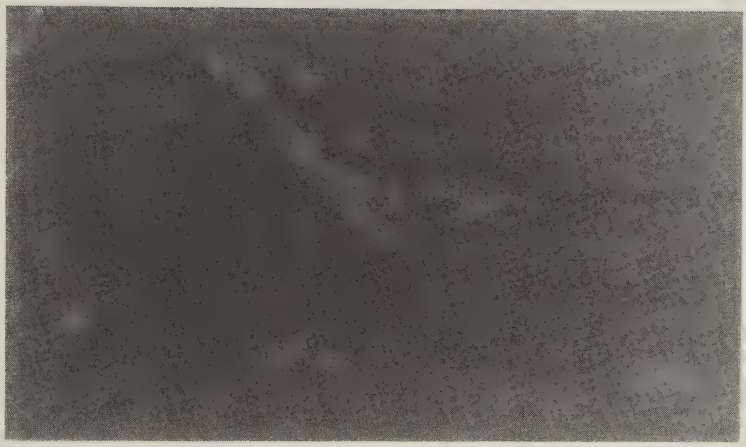


Abb. 20: Fluoreszenz des Cytoplasmas von Verozellen, die 6 Tage vorher mit Dengue-2 beimpft worden waren. Markierung des Virusmaterials mit Hilfe der obigen Immunfluoreszenzmethode.

Aufgrund der geringen Kontraste wird auf eine Darstellung der Kontrolle verzichtet.

Einschlußkörperchen oder fluoreszierende Granula waren nicht zu beobachten.

4.1.4. Dichtegradienten

Eine andere Möglichkeit einer Identitätsprüfung, d.h. eines Nachweises, daß es sich bei dem für die Inaktivierung verwendeten Materials tatsächlich um Dengue-2 Virus handelt, ist der Vergleich der sich in Saccharose- und Caesiumchlorid-Gradienten darstellenden Dichteverteilung bei den zu unter-

suchenden Proben mit den Angaben der Arbovirus Study Group (51) als auch den Daten anderer Autoren (46). Bei der Untersuchung der Hirnsuspensionen 6, 7 und 8 in den beiden Dichtegradienten ergeben sich im Saccharosegradienten (Abb. 21) und im Caesiumchloridgradienten (Abb. 22) folgende Dichteverteilungen:

Die Auswertung der Extinktionen der einzelnen Fraktionen in den Wellenbereichen für Proteine und Nucleinsäuren zeigt eine deutliche parallele Absorption in den Fraktionen 13 - 15. In den Fraktionen 17 - 21 liegt der Hauptpeak der Extinktion vor allem in der Fraktion 19. Dies entspricht beim Hauptpeak einer Dichte von 1,195 g/cm^3 bis 1,235 g/cm^3, d.h. in Fraktion 19 1,22 g/cm^3. Der zu beobachtende Nebenpeak weist eine Dichte von 1,15 bis 1,17 g/cm^3 auf.

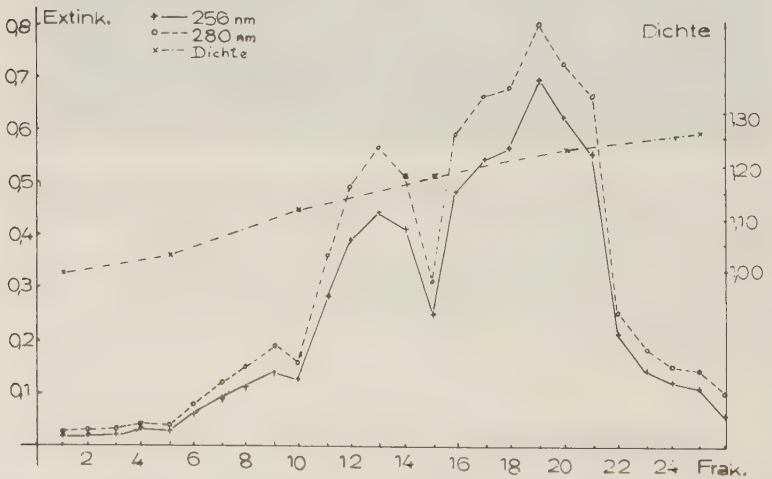


Abb. 21: Saccharosedichtegradient des nativen Dengue-2 Virusmaterials

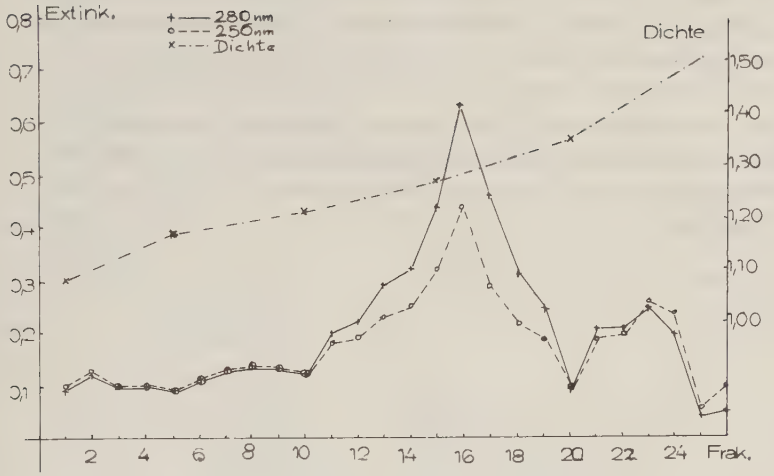


Abb. 22: CsCl-Dichtegradient des nativen Dengue-2 Virusmaterials

Im Caesiumchloridgradienten findet sich ein breitbasiger, langsam ansteigender Hauptpeak in Fraktion 11 - 19 mit entsprechenden Dichten von 1,25 bis 1,32 g/cm^3 mit einem Gipfel der Extinktion bei Fraktion 16 mit einer Dichte von 1,28 g/cm^3. Ein Nebenpeak weist eine Dichte von 1,39 bis 1,55 g/cm^3 auf.

Zusammenfassend können die Dichtekomponenten 1,16; 1,22 und 1,28 g/cm^3 dargestellt werden. Den Angaben der Arbovirus Study Group (51) und denen der Autoren STEVENS und SCHLESINGER (71) nach als auch nach denen von SMITH et al. (68), die vergleichbare Untersuchungen mit Hirnsuspensionen vornahmen, setzt sich der Dengue-Typ-2 aus einer Hauptkomponente von einer Dichte von 1,22 bis 1,24 g/cm^3 zusammen,

ferner findet sich eine "leichtere" Komponente mit einer Dichte von 1,18 - 1,21 g/cm^3 und einem "schwererem" Anteil von 1,29 - 1,31 g/cm^3. Dies entspricht den Dichtewerten der von uns gefundenen Banden in den Dichtegradienten.

Bei der Beimpfung von 3 Tage alten Babymäusen als auch von Verozellkulturen mit den 25 Fraktionen des Saccharosegradienten, ergab sich folgender Zusammenhang von Dichte und LD_{50} und PBE:

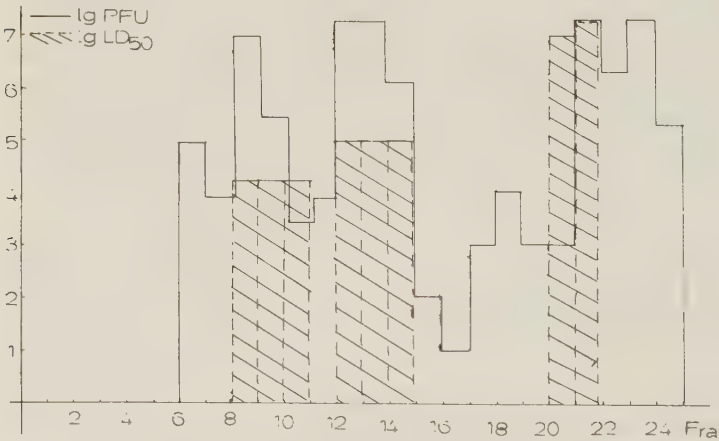


Abb. 23: Infektiosität in Zellkulturen (PFU) und Babymäusen (LD_{50}) der Fraktionen des Saccharosedichtegradienten des nativen Dengue-2 Virusmaterials

4.2. Inaktivierung

Der Verlauf der Inaktivierung wurde durch zwei Methoden überprüft.

Zum einen wurden auf Verozellen mit Hilfe des Plaque-Testes unter Carboxymethylcelluloseoverlay die Restinfektiosität der alle 4 Stunden post infektionem entnommenen Proben bestimmt.

Dabei ergab sich folgendes Bild:

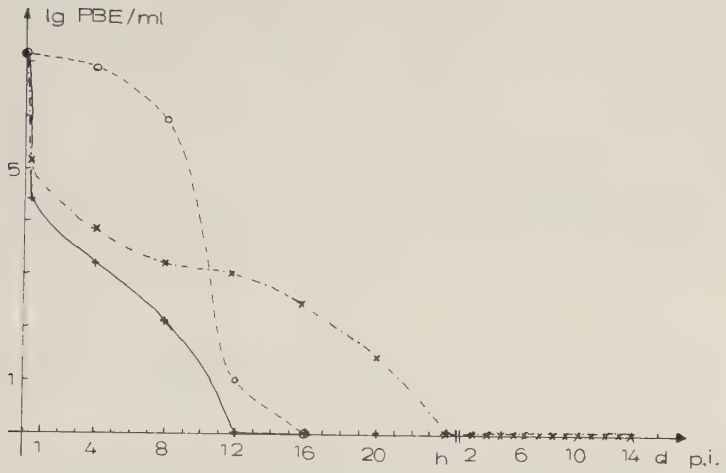


Abb. 24 + —— Hitzeinaktivierung
x -.-. Formalininaktivierung
o - - - ß-Propiolactoninaktivierung

Die durch Hitze inaktivierten Dengue-2 Suspensionen riefen 12 Stunden nach der Inokulation in Verozellen keinen cytopathischen Effekt mehr hervor. Die Formalininaktivierung mußte dazu 24 Stunden andauern. Die Inaktivierungsdauer durch ß-Propiolacton liegt zeitlich mit 16 Stunden genau zwischen Hitze- und Formalininaktivierung. Der Kurvenverlauf ist zu Beginn der Inaktivierung deutlich flacher. Die Hitze- und die Formalininaktivierung führen kurz nach Inaktivierungsbeginn zu einem steilen Infektiositätsabfall, der sich mit zunehmender Dauer deutlich verlangsamt.

Die Veränderung der Viruspartikel durch die Inaktivierungen versuchten wir durch die Dichteveränderung im Saccharose-dichtegradienten deutlich zu machen. Nach der Standardaufbereitung (s. 3.4.1.1.) boten die drei Virusaufbereitungen nach der Inaktivierung (Hitze 16 Stunden, Formalin 28 Stunden und ß-Propiolacton 20 Stunden) im Saccharosegradienten folgendes Bild:

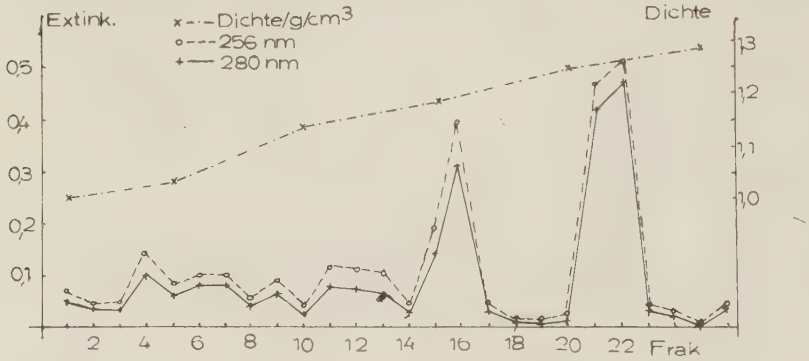


Abb. 25: Hitzeinaktiviertes Material, Saccharose-Dichtegradient

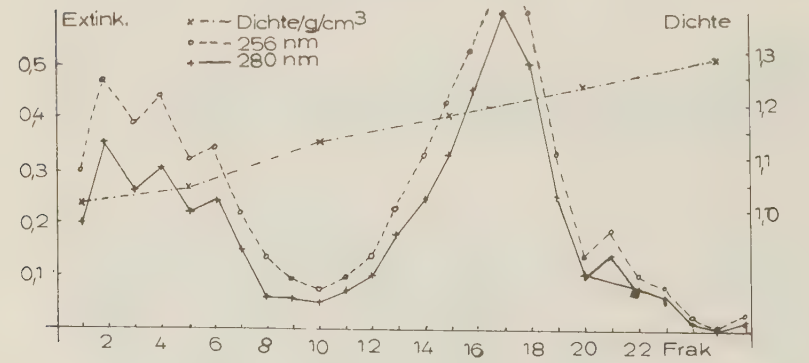


Abb. 26: ß-Propiolactoninaktiviertes Material, Saccharose-Dichtegradient

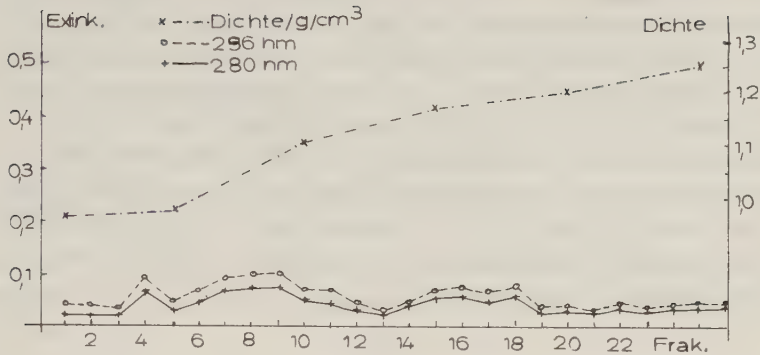


Abb. 27: Formalininaktiviertes Material, Saccharose-Dichtegradient

Beim Dichtegradienten der 16 Stunden lang mit Hitze inaktivierten Proben sieht man zwei deutliche Banden im 256 und 280 nm Bereich, und zwar bei den Dichten 1,19 und 1,26 g/cm^3. Die "leichtere" Komponente des Dengue-Virus hat seine Dichte nicht verändert. Die Hauptbande ist von 1,22 g/cm^3 zur Dichte von 1,26 g/cm^3 verschoben.

Der Gradient des 20 Stunden lang mit ß-Propiolactoninaktivierten Materials zeigt an der Oberfläche des Röhrchens eine Trübung (Fraktion 0 - 5), die nicht auswertbar ist. Eine sehr deutliche Bande zeigt sich bei einer Dichte von 1,21 g/cm^3, eine dünne, weniger deutliche bei 1,30 g/cm^3.

Im Gradienten des 28 Stunden lang mit Formalin inaktivierten Ansatzes ist sowohl im Röhrchen als auch photometrisch über der gesamten Dichtebreite von 1,00 bis 1,30 g/cm^3 keine deutliche Extinktionszunahme nachzuweisen.

Die Austitrierung der einzelnen Fraktionen der Gradienten mittels des Plaque-Testes auf Verozellkulturen in Linbro-8-Platten unter CMC-Medium, ergab in keiner der Zellkulturen einen cytopathischen Effekt. Bei der Vorbereitung der Zellkulturbeimpfung wurde den Formalin bearbeiteten Proben eine adäquate Menge (1:1) Natriumbisulfit (61) zugegeben, und die ß-Propiolacton inaktivierten Dengue-2 Suspensionen wurden vorher mit 18.000 x g 2 Stunden lang in einer Beckmann-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde in Trispuffer (pH= 7,4) aufgenommen.

4.3. Challenge-Test

Nach der Beimpfung der Würfe mit 100 LD_{50} der 8. Mäusepassage wurden die Tiere 31 Tage lang beobachtet und am 11., 14. und 31. Tag p.i. die Überlebensraten festgestellt. Es ergab sich folgendes Bild:

Kontrolltage	Hitze	Formalin	ß-Pl	Kontrolle
11	9/12	4/12	0/9	2/13
14	9/12	4/12	0/9	2/13
31	9/12	4/12	0/9	2/13

Abb. 29: Immunisierung ohne Adjuvans

Kontrolltage	Hitze	Formalin	ß-Pl	Kontrolle
11	5/9	7/9	7/12	0/11
14	5/9	4/9	5/12	0/11
31	5/9	4/9	5/12	0/11

Abb.: 30: Immunisierung mit Freund's Adjuvans

Kontrolltage	Hitze	Formalin	ß-Pl	Kontrolle
11	2/9	6/9	5/9	2/13
14	2/9	6/9	4/9	2/13
31	2/9	6/9	1/9	2/13

Abbs. 31: Immunisierung mit Aluminiumhydroxid

Hitze : mit Hitze inak.Material beimpfte Tiere
Formalin : mit Formalin inak.Material beimpfte Tiere
ß-Propiolacton : mit ß-Pl. inak.Material beimpfte Tiere

Die Anzahl der Tiere pro Wurf, die jeweils komplett mit einer Impfstoffart immunisiert wurden, betrug zwischen 9 und 13 Tieren.

Bei den Immunisierungskombinationen 1, 4 und 7, d.h. ohne Adjuvans, als auch bei den Kombinationen 3, 6 und 9, d.h. mit Aluminiumhydroxid als Zusatz, ergab der X^2-Test, daß alle Überlebensraten über 62 % signifikant höher sind, als die der Kontrolltiere.

Bei den Kombinationen 2, 5 und 8 mit Freund's Adjuvans liegt der signifikante Unterschied zu den Kontrollen bei Überlebensraten höher als 46 %. Im Diagramm verhalten sich die Überlebensraten zum Signifikanzbereich wie folgt :

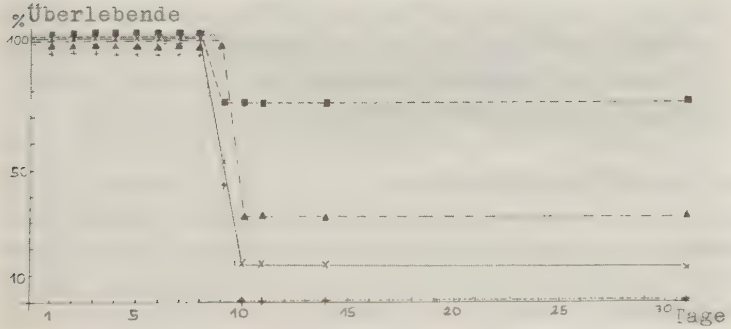


Abb. 32: Immunisierung ohne Adjuvans

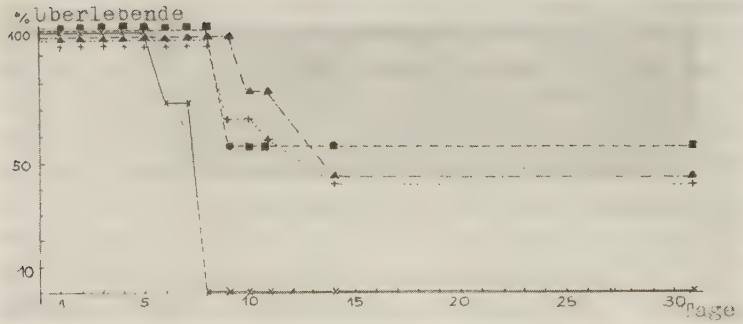


Abb. 33: Immunisierung mit Freund's Adjuvans

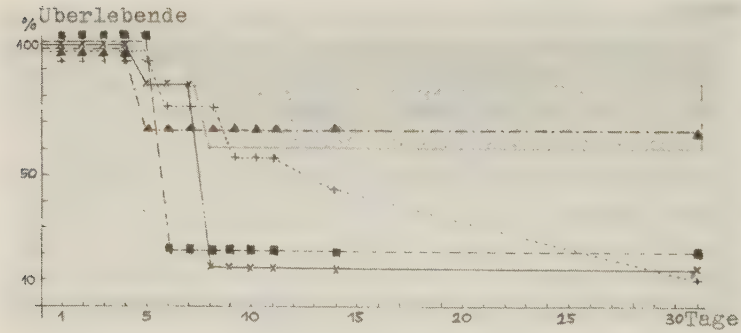


Abb. 34: Immunisierung mit Aluminiumhydroxid

x —— Kontrolltiere
■ --- Tiere mit Hitzeinak.Material
▲ -.- Tiere mit Formalininak.Material
\+ .... Tiere mit ß-Pl-inak.Material
Signifikanzbereich

Die Diagramme veranschaulichen, daß die Würfe, die mit hitzeinaktivierten Dengue-2 Virussuspensionen allein, d.h. ohne Adjuvans, beimpft wurden, als auch die, die zusätzlich

Freund's Adjuvans erhielten, über den vollen Beobachtungszeitraum von 31 Tagen p.i. Überlebensraten aufwiesen, die deutlich im Signifikanzbereich liegen.

Bei den Würfen, die mit durch Formalin inaktiviertem Virusmaterial beimpft wurden, lagen lediglich die Überlebensraten des Wurfes, der zusätzlich Aluminiumhydroxid verimpft bekam, über den vollen Zeitraum im Signifikanzbereich. Bei dem Wurf, der als Zusatz Freund's Adjuvans zur inaktivierten Virussuspension erhielt, war die Überlebensrate noch bis zum 14. Tag nach dem Challenge-Test signifikant höher als die der Kontrolltiere.

Ebenso verhielt sich die Kombination ß-Propiolactoninaktiviertes Material mit Freund's Adjuvans. Allerdings konnten alle Immunisierungskombinationen, die ß-Propiolactoninaktiviertes Virusmaterial enthielten, in keinem Fall eine signifikante Überlebensrate über den gesamten Beobachtungszeitraum erzielen.

4.4. Immunglobuline

Bei der Bestimmung der Immunglobuline wurde vor allem Wert auf die Auswertung des IgG- und IgM-Gehalts der kompletten Seren gelegt, die den Großteil der präzipitierenden, neutralisierenden (N), komplementbindenden (CF) und hämagglutinationshemmenden (HJ) Antikörper ausmachen. Auf die Bestimmung von IgA wurde verzichtet, weil die Viren bei keiner der Inokulationen eine Mucosaschicht zu passieren hatten und somit keine wesentliche IgA-Antwort zu erwarten war.

Die Durchmesser der sich bildenden Präzipitationsringe der absteigenden Verdünnungsreihen wurden gegen die der mitlaufenden Kontrollen in einer Endpunktbestimmung verglichen.

Die in den Abbildungen 35 und 36 dargestellten Titer der Immunglobuline in kompletten Seren beziehen sich also alle auf die Verdünnungsstufe, bei der kein Präzipitationsring mehr um das Stanzloch zu sehen war. Berücksichtigt man einen Titrationsfehler von $2^{0,5}$, der durch mehrmalige Titrationen desselben Serums bestimmt wurde, so ergibt die Übersicht der Abbildungen 35 und 36 folgende Ergebnisse:

Der IgG-Titer der Kontrolltiere, die ohne jegliche Behandlung mitliefen, betrug bei allen Titrationen 1:2048.

Hingegen pendelte sich der IgG-Titer der Kontrolltiere, die mit den verschiedenen Immunisierungskombinationen turnusgemäß gleichzeitig Freund's Adjuvans, Aluminiumhydroxid oder kein die Immunantwort unterstützendes Agens verimpft bekamen, in der Höhe zwischen 1:2048 und 1:4096 ein. Somit ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollen mit und ohne Adjuvantien zu erkennen.

Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den Tieren, die mit inaktiviertem Dengue-2-Virusmaterial beimpft wurden, lassen sich jedoch deutliche Unterschiede feststellen.

Immunisierungsart	Entnahmetag %	reziproke Titer ohne Adjuvans ß	mit FA &	mit Al §
Kon.	Ø	2048	2048	2048
K?	3	4096	4096	4096
K	6	4096	2048	4096
K	9	2048	1024	1024
H!	3	8192	8192	4096
		8192	16384	8192
		4096	32768	16192
	6	16384	16384	2048
		16384	16384	4096
		8192	32768	4096
	9	8192	16384	4096
		8192	16384	4096
		4096	4096	16384
F^	3	8192	2048	4096
		8192	8192	8192
		16384	8192	8192
	6	4096	4096	4096
		4096	4096	4096
		4096	8192	8192
	9	4096	4096	4096
		4096	4096	8192
		8192	8192	16384
B=	3	4096	2048	1024
		4096	4096	1024
		4096	4096	512
	6	4096	4096	2048
		4096	4096	2048
		4096	8192	1024
	9	4096	4096	4096
		4096	4096	512
		8192	8192	512

Abb.:35: Titration des IgG-Gehaltes der kompletten Seren nach Immunisierung der Mäuse

Legende:

? : mitlaufende Kontrollseren

! : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch hitzeinaktivierte Dengue-2 Suspensionen

^ : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch formalininaktivierte Dengue-2 Suspensionen

= : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch ß-propiolactoninaktivierte Dengue-2 Suspensionen

% : Tage nach letzter Impfstoffgabe

ß : ohne Adjuvanszusatz

& : mit Freund's Adjuvans

§ : mit Al $(OH)_3$

1) Vor allem die mit hitzeinaktiviertem Dengue-2 immunisierten Tiere zeigten die höchsten Titeranstiege bis zu 1:32768. Hier waren es die Seren der Mäuse, die zusätzlich Freund's Adjuvans i.p. bekamen, die gegenüber denen ohne Adjuvanszusatz bzw. mit Al $(OH)_3$ im Durchschnitt um eine Titrationsstufe (1:32768 gegenüber 1:16348) mehr IgG enthielten. Kein Unterschied ließ sich zwischen dem IgG-Gehalt der Seren von Mäusen der Hitzeinaktivierungsgruppe feststellen, die kein Adjuvans bekamen, und denen, die Aluminiumhydroxid als Zusatz hatten.

2) Die Mäuse, die formalininaktiviertes Dengue-2 verimpft bekamen, zeigten ebenfalls Titeranstiege gegenüber den Kontrolltieren, vor allem 3 Tage nach der letzten Immunisierung. Allerdings läßt sich hier kein deutlicher Unterschied der Titer der verschiedenen Immunisierungsarten mit verschiedenen Adjuvantien feststellen. Lediglich das Serum der Maus, die Dengue-2-Material, das mit Formalin inaktiviert wurde, plus Al $(OH)_3$ bekam, zeigte am 9. Tag nach der letzten Immunisierung einen Titer von 1:16384.

3) Die Seren der mit ß-propiolactoninaktivierten Dengue-2 Viren beimpften Tiere zeigten nie einen deutlichen Unterschied zu den Kontrollen.

Im Überblick über Abbildung 35 zeigt sich, daß sich über den Zeitraum von 9 Tagen nach der letzten Impfstoffgabe bei keiner der Immunisierungskombinationen ein kontinuierlicher An- bzw. Abstieg der IgG-Titer ablesen läßt. Die Titer bleiben meist gleichbleibend hoch.

Die Abbildung 36 gibt eine Übersicht der IgM-Titer der kompletten Seren der immunisierten Mäuse.

Die IgM-Titer der Kontrolltiere betrugen 1:32 bis 1:128, lediglich die Kontrolltiere, die Al $(OH)_3$ appliziert bekamen, zeigten geringere IgM-Titer.

1) Den höchsten IgM-Gehalt wiesen wiederum die Seren der Mäuse auf, die allein hitzeinaktivierten Impfstoff inokuliert bekamen, außerdem die Tiere, die zusätzlich Freund's Adjuvans erhielten.

2) Auch die anderen Immunisierungsansätze (formalin- und ß-propiolactoninaktiviertes Dengue-2 Material mit und ohne Freund's Adjuvans) zeigten deutliche Titererhöhungen gegenüber den Kontrolltieren.

3) Lediglich alle Impfstoffkombinationen mit Aluminiumhydroxid wiesen keinen deutlich höheren IgM-Gehalt als die Kontrollen auf. Nur die Kombination ß-propiolactoninaktiviertes Dengue-2 Material mit Al $(OH)_3$ zeigt noch einen Titer von 1:128 am 6. und 9. Tag nach der letzten Immunisierung.

Die drei Kombinationen hitzeinaktiviertes Material ohne Adjuvans, hitzeinaktiviertes Material mit Freund's Adjuvans und formalininaktiviertes Dengue-2 mit Freund's Adjuvans wiesen einen gleichbleibend hohen IgM-Titer auf.

Hingegen fiel der Titer der Kombination hitzeinaktiviertes Dengue-2 mit Al $(OH)_3$, formalininaktiviertes Material allein, das gleiche mit Freund's Adjuvans, ß-propiolactoninaktiviertes Material allein und das gleiche in Kombination mit Aluminiumhydroxid bis zum 9. Tag ab.

Immunisierungsart	Entnahmetag %	reziproke Titer ohne Adjuvans ß	mit FA &	mit Al §
Kontr.	ø	64	64	64
K?	3	128	32	ø
		128	128	ø
	6	64	128	32
		128	128	32
	9	128	32	4
		128	32	8
H!	3	512	128	128
		512	256	128
			256	
	6	512	128	64
		512	256	64
			256	
	9	512	128	32
		256	128	32
			512	
F^	3	512	128	32
		256	128	64
			128	64
	6	64	128	32
		32	128	64
			256	64
	9	128	128	8
		32	512	32
			1024	64
B=	3	256	128	32
		256	256	32
		256	256	64
	6	128	64	128
		128	64	128
		128	128	128
	9	128	128	4
		128	128	128
			256	128

Abb. 36: Titration des IgM-Gehaltes der kompletten Seren nach Immunisierung der Mäuse

Legende:

? : mitlaufende Kontrollen

! : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch hitzeinaktiviertes Dengue-2 Material

^ : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch formalininaktiviertes Dengue-2 Material

= : Seren von Mäusen nach Immunisierung durch ß-propiolactoninaktiviertes Dengue-2 Material

% : Tage nach letzter Impfstoffgabe

ß : ohne Adjuvanszusatz

& : mit Freund's Adjuvans

§ : mit $Al(OH)_3$

4.5. Sicherheitstest

Um eine Sicherheit für den Tierversuch zu bekommen, wurde das Virusmaterial nach der Inaktivierung (Hitze für 16 Stunden, ß-Propiolacton für 20 Stunden und Formalin für 28 Stunden) auf Restinfektiosität in 3 Tage alten Babymäusen und in Verozellkulturen unter Carboxymethylcelluloseoverlay überprüft.

Keine der mit inaktiviertem Virusmaterial beimpften Babymäuse starb in einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen.

Auf den Zellkulturen war nach Beimpfung mit kompletten, inaktivierten Dengue-2 Virussuspensionen als auch nach der Beimpfung mit jeder einzelnen Fraktion aus Dichtegradienten (s. Seite 36/37), hergestellt mit jedem der drei inaktivierten Virusansätzen, kein cytopathischer Effekt zu erkennen.

Damit kann man davon ausgehen, daß das inaktivierte Material keine Restinfektiosität besaß. Die bakteriologische Untersuchung des gleichen Materials zeigte, daß die Proben frei von aeroben und anaeroben Keimen waren.

5. DISKUSSION

Das Dengue-2 Virus, Stamm Tr 1751, stellte sich im Elektronenmikroskop als ein sphärisches Virion dar, daß einen elektronendichten Kern von ca. 25 nm Durchmesser besitzt, der nach einer elektronendurchlässigen Zone von 40 Å von einem 55 Å breiten Envelope umgeben ist. Der Gesamtdurchmesser beträgt ca. 44 nm. Dieses aus Hirnschnitten gewonnene Bild entspricht der Virusbeschreibung von MATSUMARA et al. (44), die ihre elektronenmikroskopischen Beobachtungen am Dengue-2 Virus in Verozellkulturen machten. Allerdings finden sie diese Größenangaben für das Core und das Envelope nach einem osmotischen Schock mit 4M NaCl-Lösung. Sonst ist die Virusgröße geringgradig höher, nämlich zwischen 48 und 50 nm. Die gleichen Viruspartikel findet CARDIFF (5) in LLC-MK_2 Zellen und KWANG KJUNE KO (38) in BHK_{21}- und in Verozellen. Letzterer findet innerhalb von Vakuolen des Cytoplasmas 3 - 5 Tage nach der Beimpfung erste 20 nm große Partikel, die von den gleichgroßen Ribosomen zu unterscheiden sind. Nach einem solchen Infektionszeitraum finden wir in den Hirnen der infizierten Mäuse bereits Mengen von kompletten Viruspartikeln, und zwar noch im endoplasmatischen Retikulum, in Cytoplasma und schon außerhalb der Zellen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der bereits erwähnten Arbeit von MATSUMARA et al. (44), die die ersten kompletten Viruspartikel in Verozellen bereits 18 Stunden nach der Infektion sehen, und nach 48 Stunden bereits einen Großteil der Virionen außerhalb der Zellen finden. Vergleichbare Beobachtungen machen auch OHYAMA et al. (49) mit Dengue-4 Viren in Verozellen und in Hirnschnitten infizierter Mäuse.

Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der Ermittlung der Virusvermehrungskurve, wobei

der Virustiter des Zellkulturüberstandes bestimmt wurde, ergänzt. Die Eklipse liegt bei 17 Stunden post infektionem und nach bereits 28 Stunden erreicht der Titer im Überstand die gleichen Werte wie zu Beginn der Infektion. In der Arbeit von CARDIFF (5) findet sich ein deutlicher Titeranstieg in den Überständen der LLC-MK_2-Zellkulturen erst nach 16 Stunden post infektionem. BRANDT et al. (4) finden titrierbare Virusmengen im Serum und im Hirn von Babymäusen frühestens einen Tag nach der Inokulation.

Zur weiteren Identitätsprüfung bzw. Charakterisierung des verwendeten Virusstammes diente die Gleichgewichtsultrazentrifugation im Caesiumchloridgradienten und die Ratezonal-Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten. Wir fanden im Zuckergradienten drei Banden, wobei bei der Messung im Zeiss-Photometer der Hauptpeak der beiden parallel laufenden Eiweiß und RNS-Extinktionskurven bei einer Dichte von 1,19 - 1,23 g/cm^3 lag. Das für die Zentrifugation verwendete Virusmaterial wurde aus beimpften Mäusehirnen gewonnen. SMITH et al. (68) beschreiben die Verschiebung des Hauptpeaks ihrer Gradienten von 1,18 - 1,22 g/cm^3 nach 1,19 - 1,24 g/cm^3, wenn sie das Virusmaterial statt aus LLC-MK_2 Zellen aus infizierten Mäusegehirnen gewannen. STEVENS und SCHLESINGER (71) finden eine Dichte von 1,19 - 1,24 g/cm^3 ihres aus infizierten KB-Zellen gewonnenen Dengue-2 Virusmaterials. MATSUMARA et al. (46) finden die gleiche Dichte der Hauptbande, und Nebenpeaks einer "leichteren" Bande mit einer Dichte von 1,18 - 1,21 g/cm^3 und einer "schwereren" Bande bei 1,29 - 1,31 g/cm^3, die auch wir gefunden haben, die "schwerere" Bande vor allem im Caesiumchloridgradienten. Auch in dieser Arbeit von MATSUMARA et al. wird eine Dichteverschiebung bei unterschiedlichen Quellen des Virusmaterials beschrieben. Die Autoren führen dies auf den unterschiedlichen Lipidgehalt

des Virions zurück, je nachdem in welchem Wirtsmaterial die Replikation stattfand.

In der Arbeit von BRANDT et al. (4) wird die Bande mit der Dichte von 1,23 g/cm^3 im Caesiumchloridgradienten, entsprechend der von 1,18 - 1,21 g/cm^3 Dichte im Zuckergradienten mit SHA (slow sedimenting haemagglutinin) bezeichnet. SCHLESINGER (49) sieht im SHA inkomplette Virionen, während sich komplettes Virusmaterial in der RHA-(rapid sedimenting haemagglutinin) Bande bei 1,22 - 1,24 g/cm^3 im Zuckergradienten befindet. Ferner findet sich in diesen Arbeiten eine Bande mit wesentlich geringerer Dichte, das SCF (soluable complement fixing Antigen). Dieser Bande entsprechend fanden wir hohe Infektionsdosen auf den Zellkulturen und hohe LD_{50}-Dosen in Mäusen, wenn die entsprechenden Fraktionen verimpft wurden (Abb. 23).

Nach der Inaktivierung des Virusmaterials, d.h. mit Hitze nach 16 Stunden, mit ß-Propiolacton nach 20 Stunden und mit Formalin nach 28 Stunden, konnte man deutliche Dichteveränderungen in den inaktivierten Suspensionen entdecken. Nach der Hitzeinaktivierung blieb der "leichtere" Nebenpeak bei 1,18 g/cm^3, aber die Hauptbande verschob sich von 1,24 g/cm^3 nach 1,26 g/cm^3. Das bedeutet, daß nach der Inaktivierung die Dichte gering erhöht ist, woraus man schließen kann, daß die Partikel eine geringgradige Größenveränderung in der äußeren Struktur durchgemacht haben. Trotzdem liegt die Bande noch in dem Dichtebereich, in dem das RHA, d.h. komplette Virionen banden. Eine unveränderte Dichte des Virusmaterials nach der ß-Propiolacton-Inaktivierung läßt sich ebenso wie das obige Ergebnis mit der parallelen Arbeit von WHITE et al. (76) über die Inaktivierung des Eastern Equine Encephalomyelitis Virus (EEE) vergleichen. Diese Autoren beobachteten eine ganz geringfügige Erhöhung der Dichte nach der ß-Propiolacton Inakti-

vierung, während die Dichte des hitzebearbeiteten Materials gleichbleibt. Die minimalen Dichteveränderungen führen sie auf den Abbau oder Strukturveränderungen der Lipide im Virusenvelope zurück. Nach einer Inaktivierung mit Formalin finden sie keine Bande mehr im Gradienten, was unseren Untersuchungen entspricht. Alle post inaktivationem verimpften Fraktionen der Gradienten führten nicht zur Ausbildung eines cytopathischen Effekts in Verozellkulturen wie in der Arbeit von WHITE et al. (76), die allerdings auch noch die verbleibende haemagglutinierende Wirkung der inaktivierten Virionen zur Titration heranzogen. Aber auch dabei war nach der Formalininaktivierung mit der gleichen Endkonzentration von 0,05 % kein Titer mehr in den gesamten Fraktionen des Gradienten festzustellen.

Unsere Inaktivierungsmethoden glichen denen der schon mehrfach erwähnten Arbeit von WHITE et al. (76), die das EEE-Virus mit Endkonzentrationen von 0,05 % Formalin und 0,16 % ß-Propiolacton inaktivierten und Hitze von 41° C benutzten, d.h. die gleichen Bedingungen verwendeten. Bei Anfangstitern von 10^{11} PFU/ml ist nach 72 Stunden der Hitzeinaktivierung kein Virus mehr titrierbar, ebenso nach 48 Stunden der Formalininaktivierung bei + 22° C und nach 8 Stunden der Behandlung mit ß-Propiolacton bei + 4° C. Unser Dengue-2 Stamm ließ sich hingegen am schnellsten mit + 41° C Hitze innerhalb von 12 Stunden inaktivieren (Anfangstiter von $1,6 \times 10^7$ PFU/ml), darauf folgte die ß-Propiolacton-Inaktivierung mit 16 Stunden und am langsamsten war die Formalin-Inaktivierung, die 24 Stunden benötigte, um jede Restinfektiosität zu zerstören. MUSSGAY und WEILAND (47) benutzten ebenfalls u.a. Formalin und ß-Propiolacton zur Inaktivierung ihres Semliki-Forest-Virus Stammes. Die Endkonzentrationen waren aber beim Formalin 0,3 % bei + 22° C und 0,05 % ß-Propiolacton wie bei unserer Arbeit. Bei vergleichbaren pH-Werten, d.h. bei der Formalininaktivierung

von 7,2 und bei der durch ß-Propiolacton von 7,4 ist der Verlauf der Inaktivierungskurven (Ordinate: (N_o/N) PFU, Abszisse: Zeit in min.) bei ß-Propiolacton-Einwirkung wesentlich steiler als bei Formalin-Inaktivierung und zeigt auch keine Abflachung, wie bei der letztgenannten Inaktivierungsart, bei der sich die Kurve der Geraden der Anfangsaktivität asymptotisch nähert. Allerdings werden in der Arbeit von MUSSGAY undWEILAND (47) die Kurven nicht bis zum Endpunkt der Inaktivierung angegeben. Trotz einer höheren Formalinkonzentration fanden die Autoren, wie bei unserer Arbeit, eine schnellere Inaktivierung durch ß-Propiolacton als durch Formalin. FLEMING (18) untersuchte 1971 die Inaktivierung von Semliki-Forest (SF)-Virus durch Hitze mit Temperaturen zwischen + 20 und + 50° C. Bei einem pH-Wert von 7,5 stellte er fest, daß es bei der Inaktivierung durch Hitze zwei verschiedene Mechanismen gibt, die unter- bzw. oberhalb einer Temperatur von + 41° C die Infektiosität des Virus verändern. Unterhalb von + 41° C wird lediglich die Substruktur des Virusaufbaus subtil verändert, während oberhalb von + 41° C es zum sogenannten "breakdown of surface units" kommt. Wir benutzten diese "kritische" Temperatur von + 41° C, um einerseits eine sichere Beseitigung der Infektiosität hervorzurufen, auf der anderen Seite aber eine zu starke Denaturierung zu umgehen, damit die spätere Immunisierungswirkung gewährleistet blieb. In der Arbeit von FLEMING fällt bei einer Temperatur von + 41° C die Infektiosität des SF-Virus zu Beginn der Inaktivierung um zwei Zehnerpotenzen in 30 Minuten, um sich gegen Ende asymptotisch der Abszisse zu näheren. EYLAR et al. (16) untersuchten die Hypothese von FLEMING über die verschiedenen Inaktivierungsmechanismen durch Hitze unter- bzw. oberhalb von + 41° C beim Dengue-1 Virus. Bei vergleichbarem Versuchsansatz könnten sie FLEMING's Hypothese bestätigen. Beim Dengue-1 Virus fällt die Infektiosität zu Beginn der Inaktivierung jedoch

nur um zwei Zehnerpotenzen in 3 Stunden, was unseren Werten gleichzusetzen ist.

Das Ergebnis des Challenge-Tests durch Lebendvirus in den mit unserem inaktivierten Virusmaterial beimpften NMRI-Mäusen war, daß die besten Erfolge durch die drei folgenden Immunisierungsmethoden auftraten:

1) hintzeinaktiviertes Material allein,
2) das gleiche in Verbindung mit Freund's Adjuvans und
3) formalininaktiviertes Material mit Aluminiumhydroxid.

Die anderen Kombinationen ergaben keinerlei Schutzwirkung über den gesamten Beobachtungszeitraum, lediglich die Inaktivierungsansätze mit Formalin und mit ß-Propiolacton in Verbindung mit Freund's Adjuvans verlängerten die Überlebensdauer der Tiere auf 14 Tage. In der Arbeit von WHITE et al. (76) wurden Meerschweinchen mit dem inaktivierten EEE-Virus zweimal immunisiert und anschließend nach 7 Tagen mit 10-100 LD_{50} beimpft. Den Immunisierungserfolg in diesem Challenge-Test lasen sie am Antikörperspiegel im Blut der Tiere und durch Kalkulierung der mittleren effektiven Schutzdosis (ED_{50}) ab. Sie fanden, daß vor allem der hitze- und dann der ß-propiolactoninaktivierte Impfstoff die beste Schutzwirkung hat, d.h. höhere Antikörpertiter und eine höhere ED_{50} erzeugt. Demgegenüber blieb Formalin weit zurück. Diese Immunisierungsergebnisse werden verständlich durch eine sehr hohe Haemagglutinations-Aktivität des Virusmaterials nach Hitzeinaktivierung, obwohl bei allen drei Inaktivierungsarten der Infektiositätstiter unter 0,1 PFU/ml fällt. Bei der ß-Propiolacton-Inaktivierung bleibt ein mittelhoher HA-Titer, während er bei Formalin kleiner als 1 - 5 wird. Auch bei uns findet sich nach der Inaktivierung bei allen drei Ansätzen keine titrierbar Infektiosität mehr. Ebenfalls bietet die Hitzeinaktivierung auch bei uns nicht nur die besten Er-

gebnisse im Challenge-Test, sondern auch die höchsten IgG- und IgM-Titer im Serum. IgG und IgM stellen ja den größten Teil der präzipitierenden Antikörper dar. In der weiteren Reihenfolge bietet aber bei uns genau umgekehrt die Formalininaktivierung vor der durch ß-Propiolacton die besseren Ergebnisse. Formalin als beste Substanz zur Herstellung einer inaktivierten Vaccine bei guten Immunisierungsergebnissen, erarbeiteten MUSSGAY und WEILAND (47) bei der Inaktivierung des Semliki-Forest-Virus und einem Challenge-Test 10 Tage nach einer einmaligen Immunisierung mit 0,2 ml inaktivierten Materials. Sie benutzten ebenfalls ß-Propiolacton zur Inaktivierung und auch Freund's Adjuvans sowie Aluminiumhydroxid zur Unterstützung der Immunisierung. Nach der Formalin-Vaccine war das mit ß-Propiolacton inaktivierte Material die zweitbeste immunisierende Vaccine.

Daneben sind zwei Ergebnisse zur Beurteilung zweier Phänomene unserer Arbeit von Wichtigkeit. Einmal die Beobachtung, daß bei der formalininaktivierten SFV-Vaccine Aluminiumhydroxid die Schutzwirkung geringgradig verstärkte, während Freund's Adjuvans sie verringerte. Bei uns konnte der Formalinimpfstoff auch nur unter Zusatz von Aluminiumhydroxid die Überlebensrate über die volle Beobachtungsdauer im Signifikanzbereich halten.

Im Gegensatz dazu verlor das hitzeinaktivierte Material unter Zusatz von Aluminiumhydroxid seine signifikant protektive Wirkung. Dieses Phänomen der Verringerung der Wirkung beobachten MUSSGAY und WEILAND in ähnlicher Weise bei der Kombination ihrer Saponin-Vaccine mit $Al(OH)_3$. In der Arbeit von CASALS et al. (6) findet sich 24 Stunden nach einer einmaligen Injektion verschiedener durch Formalin (0,5 %) inaktivierter Arbovirussuspensionen (außer Dengue) in weißen Mäusen ein Schutzeffekt gegenüber einer Infektionsbelastung mit 10-100 LD_{50} Lebensvirus.

Bei der Bestimmung der Immunglobuline IgG und IgM im Serum unserer Mäuse, 3, 6 und 9 Tage nach der letzten Immunisierung, d.h. 30, 33 und 36 Tage nach dem ersten Immunisierungstermin fanden sich folgende Ergebnisse: Die höchsten IgG-Titer fanden sich bei den Immunisierungen mit hitzeinaktiviertem Material, ob mit oder ohne Adjuvantien. Bei den Formalin-Vaccinen fanden sich gering niedrigere IgG-Titer, während bei den Immunisierungen mit ß-Propiolacton kein IgG-Titeranstieg gegenüber den Kontrollen festzustellen war. Diese Abstufung in den IgG-Titern läuft zu der Bewertung der Schutzwirkungen der Vaccinen parallel. Es zeigt sich, daß bei allen inaktivierten Viruschargen ohne Adjuvantienzusatz und bei denen mit Freund's Adjuvans als Zusatz sich gleich hohe IgM-Titer ergeben. Lediglich alle Immunisierungsansätze mit Aluminiumhydroxid zeigen keinerlei IgM-Titeranstieg gegenüber den Kontrollen. Die Arbeiten von SCOTT et al. (64), RUSSEL et al. (60), EDELMAN et al. (14) und BRANDT et al. (3) stimmen in ihren Ergebnissen dahin überein, daß auf eine Arbovirus- bzw. Denguepримärinfektion in Versuchspersonen bzw. -tieren eine Immunantwort auftritt, bei der zunächst kurzlebige 19S-Antikörper auftreten, die dem IgM entsprechen und vor allem haemagglutinationsinhibierende und neutralisierende Antikörperaktivität entwickeln. Später treten 7S-, d.h. IgG-Antikörper auf, während die IgM-Titer wieder abfallen. Bei einer Sekundärinfektion, z.B. bei Dengue-3 und 4 (HALSTAED (24)) wird zunächst nur IgG, d.h. 7S-Antikörper, gefunden, die vor allem haemagglutinationsinhibierende Wirkung haben, aber auch vom komplementbindenden Typ sind. IgM- oder 19S-Antikörper können, müssen aber bei einer sekundären Infektion nicht auftreten. So ist auch bei unserem Versuchsansatz durch die fünf aufeinanderfolgenden Immunisierungen die Immunantwort mit hohen IgG-Titern bei geringen IgM-Titern wie eine Immunreaktion auf eine Sekundärantwort anzusehen.

Die Übersicht über Dengue-Viren von SCHLESINGER (62) befaßt sich im Abschnitt über Vaccinen vor allem mit der Darstellung der Ansätze zu attenuierten Vaccinen. Die referierte Arbeit von PRICE et al. (54) wird dahin beurteilt, daß die Art und Weise der Gewinnung der Mutanten (129 Passagierungen in der Maus und die Reinigung in Verozellen) zu umständlich ist für den praktischen Gebrauch. WISSEMAN et al. (78) entwickelten einen attenuierten Dengue-Stamm, der temperaturempfindlich in hyperthermen Mäusen war. Die Mutante besaß keine Pathogenität für den Menschen mehr, führte aber noch zur Immunisierung. Jedoch ist Material aus Hirngewebe als Vaccine im Menschen nicht denkbar. Ebenfalls nur in Tieren durchführbar ist die Immunisierung durch lebendes Dengue-Virusmaterial, wie es HALSTAED et al. (24) in Affen mit Dengue-1 - 4 durchführten, wodurch eine gute Schutzwirkung gegen eine Dengue-2-Zweitbeimpfung erreicht wurde. Die bereits oben erwähnten Arbeiten von PRICE et al. (54) und EDELMAN et al. (14) zeigen nach Mehrfachimpfungen mit lebendem Dengue-2 sowie Japanes Encephalitis-Virus hohe HI-, bzw. IgG-Titer im Serum 7 - 14 Tage und IgM-Titer 14 - 21 Tage post infektionem. Man kann also mit solchen attenuierten Stämmen gute Immunisierungen hervorrufen.

Die ebenfalls bereits oben aufgeführten Arbeiten von MUSSGAY und WEILAND (47), FLEMING (18) und EYLAR et al. (16), die zur Immunisierung der verschiedensten Versuchstiere inaktiviertes Arbovirus- bzw. Dengue-2-Material verwendeten, zeigten mit unserer Arbeit vergleichbare Ergebnisse, d.h. daß im Hinblick auf die Schutzwirkung gegenüber einem Challenge-Test mit Lebendvirus, allen voran die Hitzeinaktivierung die besten Ergebnisse zeigt, danach folgt die Formalininaktivierung, die der durch ß-Propiolacton vorzuziehen ist. WHITE et al. (76) fanden jedoch beim EEE-Virus, daß die Schutzwirkung der verschiedenen Vaccinen in umgekehrter Reihenfolge auftritt. Freund's Adjuvans erhöhte die Immu-

nisierungswirkung nur bei der Hitzevaccine, während Aluminiumhydroxid die Formalinvaccine so unterstützte, daß die Überlebensraten der durch sie immunisierten Tiere signifikant höher lagen. Allerdings ergibt sich aus mehreren Arbeiten, die bei HILLEMANN (28) zusammengefaßt sind, daß Freund's Adjuvans aufgrund des Auftretens von Granulomen am Injektionsort bei Versuchstieren sowie Amyloidosis, nephrotischem Syndrom und Plasmazell-Neoplasmen im Menschen nicht angewandt werden kann, obwohl anfangs des Jahrhunderts in einigen hunderttausend Menschen bereits Freund's inkomplettes Adjuvans z.B. bei Influenzavaccinen ohne Nebenwirkungen eingesetzt wurde.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Arbeit zeigt, daß über einen langen Immunisierungszeitraum von 27 Tagen mit fünf Immunisierungsterminen, davon anfangs zwei subcutane Injektionen und im Abstand von drei intraperitoneale Injektionen, eine Antikörperinduzierung mit unseren inaktivierten Dengue-2 Vaccinen möglich ist, d.h. ein Schutz gegenüber einem intracerebralen Challenge-Test mit 100 Ld_{50} Lebendvirus in der weißen Maus hervorgerufen werden kann, ohne daß es, wie sonst nach mehrfachem Viruskontakt möglich, zu einer Schocksymptomatik kam.

Die beste Schutzwirkung und die höchsten IgG-Titer (wie bei einer Sekundärinfektion) erzeugte das Virusmaterial, welches mit + 41° C über einen Zeitraum von 16 Stunden inaktiviert worden war. Die weitere Reihenfolge, nach abnehmender Wirksamkeit geordnet, war Formalininaktivierung (0,05 %, 28 Stunden) vor der durch ß-Propiolacton (0,16 %, 20 Stunden). Freund's Adjuvans erhöhte nur in Kombination mit der Hitzevaccine die immunogene Wirksamkeit signifikant. Aluminiumhydroxid verringerte sie hingegen, aber in Kombination mit der Formalin-Vaccine führte es zu einer Verbesserung der Schutzwirkung. Alle oben erwähnten Kombinationen zeigten hohe IgG-Titer bei geringem IgM-Anstieg 3 bis 9 Tage nach der letzten Immunisierung.

Zwar sind die Virussuspensionen aus Hirngewebe gewonnen und damit nicht für den Einsatz im Menschen geeignet, aber die Ergebnisse können auf tierexperimenteller Ebene als Grundlage für weitere notwendige Untersuchungen der gleichen Inaktivierungs- und Immunisierungsart mit Virusmaterial von Zellkulturen angesehen werden, wobei die Austestung der Immunisierung in höheren Säugetieren unter ständigen Viruskontrollen mit Methoden, wie sie auch in dieser Arbeit angewendet wurden, erfolgen müßte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) ANONYMUS

Week.Epidem.Record

(1969) 44, 147 - 149, 272 - 74, 454, 488, 503, 520, 625 - 28

(1970) 45, 201 - 4, 469 - 70

(1971) 46, 148, 237 - 40

(1972) 47, 57, 316 - 17

(1973) 48, 117 - 124

(1974) 49, 33 - 40, 57 - 64, 133, 35, 277 - 79, 377

(1975) 50, 119, 137, 162, 174, 269 - 72

(1976) 51, 75, 81, 90, 373

(1977) 52, 99 - 100, 243, 394 - 95, 400

(1978) 53, 84 - 86, 113 - 16, 225, 286 - 87, 295, 318 - 19, 341

2) BOONPUCKNAVIG, S.; VUTTIVIROJANA, O.; SIRIPONT, J.; FUTRAKUL, P.; NIMMANNITYA, S. (1975)

Indirect fluorescent antibody technic for demonstrating of serum antibody in dengue hemorrhagic fever cases

Am.J.Clin.Pathol. 64, 365 - 71

3) BRANDT, W.E.; CARDIFF, R.D.; RUSSELL, P.K. (1967)

Production and characterization of arbovirus antibody in mouse ascitic fluid

Am.J.Trop.Med.Hyg. 16, 339 - 47

4) BRANDT, W.E.; CARDIFF, R.D.; RUSSELL, P.K. (1970)

Infectous dengue virions and antigens in brain and serums of infected mice

J. Virol. 6, 500 - 506

5) CARDIFF, R.D.; RUSS, S.B.; BRANDT, W.E.; RUSSELL, P.K. (1973)

Cytological localization of dengue-2 antigen: an immunological study with ultrastructural correlation

Infect.Immun. 7, 809 - 16

6) CASALS, J.; BUCHLEY, S.M. and BARRY, D.W. (1973)

Resistance to arbovirus challenge in mice immediately after vaccination

Appl.Microbiol. 25, 755 - 62

7) CHENG, P.Y. (1958)

The inactivation of group B arthropod-borne animal viruses by proteases

Virology 6, 129

8) CHATURVERDI, UC (1974)

Clinico-virological study of an outbreak of dengue-like illness at Hardoi

Indian J.Med.Res. 62, 827 - 30

9) CHATURVERDI, UC (1972)

Clinico-virological study of the recurrence of dengue epidemic with haemorrhagic manifestations at Kanpur during 1969

Indian J.Med.Res. 60, 329 - 33

10) COLE, G.A.; WISSMAN, Jr.C.L. (1973)

Immunfluorescent and histological studies Pathogenesis of dengue type 1 virus infection in suckling, weanling and adult mice

J.Comp.Pathol. 83, 243 - 52

11) COLE, G.A.; WISSMAN, Jr.C.L. (1973)

The relation of virus replication to interferon an antobody formation

Am.J.Epidemiol. 89, 669 - 79

12) Collaborative Study (1966)

Report of dengue vaccine trial in the Caribbean 1963

Bull.Wld.Hlth.Org. 35, 93

13) ECKELS, K.H.; BRANDT, W.E.; HARISSON, V.R.; McCOWN, J.M. and RUSSELL, P.K. (1976)

Isolation of temperature-sensitive dengue-2 virus under conditions suitable for vaccine development

Infect.Immun. 14, 1221 - 27

14) EDELMAN, R.; NISALAK, A.; PARIYANONDA, A.; UDOMSAKDI, S. and JOHNSEN, D. (1973)

Immunglobulin response and viremia in dengue-vaccinated gibbons repeatedly challenged with Japanes Encephalitis virus

Am.J.Epidemiol. 97, 208 - 18

15) EHRENKRANZ, NJ (1971)

Pandemic dengue in the Caribbean countrys and the southern Unites States-past, present and potential problems

N.Engl.J.Med. 285, 1460 - 69

16) EYLAR, O.R.; WISSEMAN, Jr.C.L. (1975)

Thermal inactivation of type 1 dengue virus strains

Acta Virol. 19, 167 - 68

17) FAGBANI, AH; et al. (1977)

Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkey and humans

Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 71, 60 - 65

17a) FAGBANI, AH; et al. (1976)

Epidemiology of dengue infections in Nigeria: virus isolation and clinical observations

Am.J.Trop.Med.Hyg. 79, 226 - 28

18) FLEMING, P. (1971)
Thermal inactivation of Semliki Forest virus
J.Gen.Virol. 13, 385 - 91

19) FRENCH, G.R.; McKINNEY, R.W. (1963)
Use of ß-propiolactone in preparation of inactivated arbovirus serologic test antigens
J.Immunol. 92, 772 - 78

20) FUJITA, N.; ODA, K.; YASUI, Y.; HOTTA, S. (1969)
Research on dengue in tissue culture. IV Serologic responses of human beings to combined inoculations of attenuated, tissue-cultured type 1 dengue virus and yellow fever vaccine
Kobe.J.Med.Sci. 15, 163 - 80

21) FUJITA, N.; TAMURA, M and HOTTA, S. (1975)
Dengue virus plaque formation on microplate cultures and its application to virus neutralization
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148, 472 - 75

22) GEORGE, S.; SOMAN, R.S. (1975)
Studies on dengue in Bangalore City: isolation of virus from Man and mosquitos
Indian J.Med.Res. 63, 396 - 401

23) GERMER, W.D.
Übertragbare Krankheiten, S. 80
in Gross, R., Schölmerich, P.
"Lehrbuch der Inneren Medizin"
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1977

24) HALSTEAD, S.B.; CASALS, J.; SHOTWELL, H. and PALUMBO, N. (1973)
Studies on the immunization of monkeys against dengue
Protection derived from single and sequential virus infections
AmJ.Trop.Med.Hyg. 22, 365 - 74

25) HALSTEAD, S.B.; CASALS, J.; SHOTWELL, H. and PALUMBO, N. (1973)

Studies on the immunization of monkeys against dengue
Protection following inoculation of combinations of ciruses

AmJ.Trop.Med.Hyg. 22, 375 - 81

26) HAYES, RO; FRANCY, DB; LAZUICK, JS; SMITH, GC; JONES, RH (1976)

Arbovirus surveillance in six states during 1972

AmJ.Trop.Med.Hyg. 25, 48 - 76

27) HERMON. Y.E. (1972)

Isolation of two strains of dengue type 2 virus from human cases in Ceylon

Indian J.Med.Res. 60, 221 - 25

28) HILLEMAN, M.R. (1966)

Critical apraisal of emulsified oil adjuvans applied to viral vaccines

Progr.Med.Virol 8, 131 - 182

29) HOTTA, S.; EVANS, C.A. (1956)

Ether-sensitivity of dengue virus

Virilogiy 2, 704

30) IFFT, J.B.; VOET, D.H.; VINOGRAD, J. (1961)

The determination of density distributions and density gradients in binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge

J.Phys.Chem. 65, 1138 - 65

31) ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. (1969)

Complement-fixing activity of antibodies associated with different classes of immunoglobulins

J.Immunol. 102, 1337

32) ISMANGAN (1972)

Dengue haemorrhagic fever in Jagjakarta, Central Java

Paediatr.Indones 12, 49 - 54

33) JUSATZ, H.J. (1972)

Current spread of dengue haemorrhagic fever in South Asia

Med.Klinik 67, 152 - 56

34) KÄRBER, G. (1931)

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 162, 380

35) KALVA, N.L.; GHOSL, T.K.; PATTANAYAK; WATTAL, B.L. (1976)

Epidemiological and entomological study of an outbreak of dengue fever at Ajmer, Rajasthan in 1969

J.Com.Des. 8, 261 - 79

36) KUBERSKI, T.; ROSEN, L. (1977)

A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitos by immunofluorescence

Am.J.Trop.Med.Hyg. 26, 533-37

37) KUBERSKI, T. (1977)

Indentification of dengue viruses using complement fixing antigen produced in mosquitos

Am.J.Trop.Med.Hyg. 26, 538 - 43

38) KWANG KJUNE KO (1976)

Development of dengue type 4 in BHK_{21} Cells.

Biken J. 19, 43 - 51

39) LORENZ, R.J. (1963)
Zur Statistik des Plaque-Testes
Arch.f.d.ges.Virusforsch. 12, 108 - 37

40) De MADRID, A.T.; PORTERFIELD, J.S. (1969)
A simple micro-culture method for the study of goup B Arboviruses
Bull.WHO 40, 113

41) MAHNEL, H. (1961)
Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen
Arch.Virusforsch. 10, 529 - 39

42) MAHNEL, H. (1962)
Tierexperimentelle Arbeiten mit Vakzine-Antigen
Arch.Virusforsch. 11, 658 - 66

43) MARSHALL, I.D. (1972)
Dengue in the Pacific
Med.J.Aust. 2, 1320 - 1

44) MATSUMURA, T.; HOTTA, S. (1971)
Electron microcopic observations on the purified dengue virus (type 1)
Kobe J.Med.Sci. 17, 85 - 96

45) MATSUMURA, T. (1971); STOLLAR, V.; SCHLESINGER, R.W.
Studies on the nature of dengue viruses.
V.Structure and development of dengue virus in Verocells
Virology 46, 344 - 55

46) MATSUMURA, T.; TAKEHARA, M; HOTTA, S. (1967)
Some fundamental characteristics of dengue and yellow fever viruses; inhomogeneity and characterization of partially purified viral particles
Kobe J.Med.Sci. 13, 273 - 93

47) MUSSGAY, M.; WEILAND, E. (1937)

Preparation of inactivated vaccines against Alphavirus using Semliki Forest virus-white mouse as a model
I. Inactivation experiments and evaluation of double inactivated subunit vaccines

Intervirology 1, 259 - 68

48) NOVAKHATSKY (1973)

Infectivity and haemagglutination of Venezuelan Equine Endephalitis virus. Inactivation by heat.

Vopr.Virusol. 2, 163 - 67

49) OHYAMA, A.; IGARASHI, A.; MANTANI, M.; NAITO, T.; NAITO, P.; TUCHINDA, P. and FUKAI, K. (1967)

Morphological studies on dengue virus infected tissue

The 15th Annual Meeting of the Society of Japanese Virologists. Virus 17, 316/17

50) POLLEY, J.R.; GUERIN, M.M. (1957)

The Use of ß-propiolactone for the preparation of virus vaccines. II. Antigenicity

Can.J.Microbiol. 3, 871 - 77

51) PORTERFIELD, J.S.; CASALS, J.; CHUMAKOV, M.P.; GAIDAMOVICH, S.Ya.; HANNOUN, C.; HOLMES, I.H.; HORZINEK, M.C.; MUSSGAY, M.; OKER-BLOM, N.; RUSSELL, P.K. and TRENT, D.W. (1978)

Togaviridae

Intervirology 9, 129 - 48

52) POTTER, M.; BOYA, C.R. (1962)

Induction of plasmacell neoplasma in strain BALB/s mice with mineral oil and mineral oil adjuvants

Nature,London 193, 1086 - 87

53) PRICE, W.H.; CASALS, J.; O'LEARY, W. (1974)

Studies on the sequential immunization against Group B arboviruses in Squirrel Monkeys, Cynomolugus Monkeys, Rhesus Monkeys and Chimpanzees,

Am.J.Trop.Med.Hyg. 23, 118 - 30

54) PRICE, W.H.; CASALS, J.; THIND, I.; O'LEARY, W. (1973)

Sequential immunization procedure against Group B Arboviruses unsing living attenuated 17D Yellow fever virus, living attenuated Langat E5 virus, and living attenuated Dengue 2 virus

(New Guinea C isolate)

Am.J.Trop.Med.Hyg. 22, 509 - 23

55) PRICE, W.H.; THIND, I.S.; O'LEARY, W. (1973)

The attenuation of the 26th mouse brain passage of New Guinea C strain of dengue 2 virus for use in the sequential immunization procedure against Group B arboviruses

Am.J-Trop.Med.Hyg. 22, 92 - 99

56) ROMEIS, B. (1968)

Mikroskopische Technik

R. Oldenbourg Verlag
München - Wien 15. Auflage

57) RAO, B.L. (1976)

Plaque formation of dengue viruses in Vero cell cultures under Carboxymethylcellulose overlay

Indian J.Med.Res. 64, 1709 - 12

58) RIVAI (1972)

Dengue and dengue haemorrhagic fever in Bandung

Paediatr.Indones. 12, 40 - 48

59) ROSEN, L. (1977)

The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever

Am.J.Trop.Med.Hyg. 26, 337 - 43

60) RUSSEL, P.K.; INTAVIVAT, A.; KANCHANAPILANT, S. (1969)

Anti-dengue immunoglobulins and serum ß1c/a globulin levels in dengue shock syndrome

J.Immunol. 102, 412 - 20

61) RYNZO, W.T. (1976)

Dengue outbreaks in Guanica-Eusenada and Villalba, Puerto Rico.

Am.J.Trop.Med.Hyg. 25, 136 - 45

62) SCHLESINGER, R.W. (1973)

Dengue-viruses

Virol.Monographs 16

63) SCHULZE, I.T.; SCHLESINGER, R.W. (1963)

Plaque assay of dengue and other Group B arboviruses under Methyl Cellulose Overlay Media

Virology 19, 40 - 48

64) SERIE, C. (1972)

Dengue in Frensh Guiana

Bol.Og.Sanit.Panam. 72, 229 - 35

65) SCOTT, R.; RUSSEL, P.K. (1972)

Complement fixation blocking activity of anti-dengue IgM antibody

J.Immunol. 109, 875 - 77

66) SMITH, C.E.G. (1969)
Arbovirus Vaccines
Brit.Med.Bull. 25, 142 - 47

67) SMITH, T.J. (1971)
Dengue control on an island in the Gulf of Thailand. II. Virological studies
Am.J.Trop.Med.Hyg. 20, 715 - 19

68) SMITH, T.J.; BRANDT, W.E.; SWANSON, J.L.; Mc.COWN, J.M.; BUESCHER, E.L. (1970)
Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens
J.Virol. 5, 524 - 32

69) SPEARMAN, C. (1908)
The method of "right or wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formulae
Brit.J.Psychol. 2, 227

70) SRIURAIRATNA, S.; BHAMARAPPRAVATI, N.; PHALAVADHTANA, O. (1973)
Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type 2 virus in suckling mouse neurons
Infet.Immun. 8, 1017 - 28

71) STEVENS, T.M.; SCHLESINGER, R.W. (1965)
Studies on the nature of dengue viruses. I. Correlation of particle density, infectivity, and RNA content of type 2 virus
Virology 27, 103 - 12

72) STIM, T.B.; HENDERSON, J.R. (1966)
Further studies on multiplication of dengue viruses in various host systems
Pro.Soc.Exp.Med.Biol. 122, 1004

73) STIM, T.B. (1969)

Arbovirus plaquing in two Simian kidney cell lines

J.Gen.Virol. 5, 329

74) STOLLAR, V. (1969)

Dengue virus protein: Analysis by sucrose gradient centrifugation and gel elektrophoresis

Virology 39, 426 - 38

75) TARR, C.G. (1976)

Chemically induced temperature-sensitive mutants of dengue type 2: comparison of temperature sensitivity in vitro with infectivity in suckling mice, hamsters and Rhesus monkeys

Infect.Immun. 13, 688,- 95

76) WHITE, A.; BERMAN, S. and LOWENTHAL, J.P. (1971)

Inactivated EEE Vaccines prepared in monolayer and concentrated suspension Chick embryo cultures

Appl.Microbiol. 22, 209 - 13

77) WIRTH, W.

Psychophysik. In: Handbuch der physiologischen Methodik, Bd. III, 2, hrsg. von R. Tigerstedt, Hirzel

Leipzig 1912 (S. 89)

78) WISSEMAN, C.L.

Attenuated living type 1 dengue vaccines

Am.J.Trop.Med.Hyg. 12, 620 - 63

79) YOSHINAKA, Y,; HOTTA, S. (1971)

Dengue virus purification from culture fluid of infected BHK-21 cells

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 137, 1047 - 51

LEBENSLAUF

Am 8. Oktober 1955 wurde ich, Andreas Schwartz, als Sohn des grad.Bauingenieurs Karl-Heinz Schwartz und seiner Frau Inge geb. Bornkamp in Stozenau/Weser geboren.

Von 1962 bis 1965 besuchte ich die Volksschule, Gewerbeschulstraße in Wuppertal-Barmen. 1966 wechselte ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Carl Duisberg, an dem ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Seit dem Wintersemester 1974/75 studiere ich an der Universität Düsseldorf Humanmedizin und habe seitdem 1976 die ärztliche Vorprüfung und 1977 und 1979 die erste und zweite ärztliche Prüfung abgelegt.

Herrn Professor Dr. med. H.-W. SCHLIPKÖTER danke ich für die wissenschaftliche Leitung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Ferner gilt mein besonderer Dank Herrn Ltd. Medizinaldirektor Dr. med. K.H. RICHTER für die Anregung, die Überlassung des Themas und die Initiierung der Arbeit.

Weiterhin sei Herrn Dr. med. vet. J. PILASKI für die stets gewährte wissenschaftliche und menschliche Unterstützung gedankt.

Für die Überlassung des Dengue-Virusstammes und der spezifischen Antiseren danke ich Herrn Professor Dr. med. Chr. KUNZ in Wien.

Allen Mitarbeitern des jetzigen Instituts für Umwelthygiene, vormals Landesimpfanstalt, danke ich herzlich für die mir erwiesene Hilfe.